

**NEUE SESQUITERPENESTER
AUS PARTHENIUM INTEGRIFOLIUM L.
UND POLYACETYLENE
AUS ECHINACEA PALLIDA NUTT.**

Ikhlas Ahmad Khan



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Neue Sesquiterpenester aus Parthenium integrifolium L.
und Polyacetylene aus Echinacea pallida NUTT.

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Ikhlas Ahmad Khan
aus
Amroha (Indien)

Januar 1987

1. Berichterstatter : Professor Dr. H. W a g n e r
 2. Berichterstatter : Professor Dr. E. R e i m a n n
- Tag der mündlichen Prüfung : 26. Februar 1987



drucken + binden
gmbh
Schellingstraße 23
8000 München 40
☎ 089/28 44 45

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A. <u>E I N L E I T U N G</u>	1
B. <u>A L L G E M E I N E R T E I L</u>	2
I. Kenntnisstand über Echinacea	2
I.1 Systematik und Verbreitung	2
I.2 Botanische Beschreibung	2
I.2.1 Echinacea angustifolia	2
I.2.2 Echinacea pallida	6
I.2.3 Echinacea purpurea	8
I.3. Medizinische Anwendung	11
I.3.1 Geschichtliches	11
I.3.2 Derzeitige Anwendung	12
I.4 Bisher bekannte Inhaltsstoffe von Echinacea angustifolia und Echinacea purpurea ...	15
I.5 Bisherige phytochemische und pharmakologische Untersuchungen von Echinacea purpurea und Echinacea angustifolia	17
I.5.1 Echinacea purpurea	17
I.5.2 Echinacea angustifolia und Echinacea pallida	19
II. Kenntnisstand über Parthenium integrifolium, eine Verfälschung von Echinacea purpurea	20
II.1 Verbreitung und Botanik	20
II.2 Volksmedizinische Anwendung	22
II.3 Bisher bekannte Inhaltsstoffe	23
C. <u>S P E Z I E L L E R T E I L</u>	24
III. Isolierung von neuen Terpenen aus Parthenium integrifolium	24
III.1 Orientierende Dünnschichtchromatographie	24
III.2 Voruntersuchungen mit HPLC	28
III.3 Extraktion	28
III.4 Säulenchromatographie	30
III.5 Präparative Dünnschichtchromatographie	30
III.6 Reinheitsprüfung der Substanzen	30
III.7 Präparative HPLC	31
IV. Strukturaufklärung der Verbindungen 1, 2a, 2b, 3	33
IV.1 Identifizierung der Säurekomponente ...	33
IV.2 Strukturaufklärung von Verbindung 1 ...	36
IV.2.1 Spektroskopische Untersuchungen	36
IV.2.2 Röntgenstrukturanalyse von Alkohol 1 ..	37
IV.2.3 Hochfeld-NMR	40
IV.3 Strukturaufklärung von Alkohol 2a	46
IV.3.1 COSY-Spektren	51
IV.4 Strukturaufklärung von Alkohol 2b	57
IV.4.1 Spektroskopische Voruntersuchungen	57
IV.4.2 Röntgenstrukturanalyse von Alkohol 2b .	59
IV.5 Strukturaufklärung von Alkohol 3	61
IV.5.1 COSY-Spektrum	64
IV.6 Stellung der Esterverknüpfung der Ester 1, 2a, 2b, und 3	73

V.	Pharmakologische Untersuchungen der Sesquiterpenester aus <i>Parthenium integrifolium</i>	76
V.1	Beschreibung der verwendeten Testsysteme	76
V.1.1	Granulozyten-Test nach BRANDT	76
V.1.2	Carbon-Clearance-Test nach BIOZZI	78
V.1.3	Antivirale Wirkung	79
V.1.4	Immun-Teste	80
V.1.5	Wirkung gegen <i>Candida albicans</i>	80
VI.	Isolierung neuer Polyacetylene aus <i>Echinacea pallida</i>	81
VI.1	Extraktion	81
VI.2	Voruntersuchungen	81
VI.2.1	Dünnschichtchromatographie	81
VI.2.2	Analytische HPLC	81
VI.3	Säulenchromatographie	83
VI.4	Semipräparative HPLC	85
VII.	Strukturaufklärung der Acetylen Verbindungen	87
VII.1	Strukturaufklärung von Substanz 1	87
VII.2	Strukturaufklärung der Verbindung 2 und 2'	93
VII.2.1	Strukturaufklärung von Substanz 2	94
VII.2.2	Strukturaufklärung von Substanz 2'	98
VIII.	Zur Verfälschung von <i>Echinacea purpurea</i> Wurzeln mit <i>Parthenium integrifolium</i> Wurzeln	103
VIII.1	Morphologische Untersuchungen	106
VIII.2	Chromatographischer Vergleich	106
IX.	Verwechslung von <i>Echinacea angustifolia</i> mit <i>Echinacea pallida</i>	110
D.	<u>Z U S A M M E N F A S S U N G</u>	113
E.	<u>E X P E R I M E N T E L L E R T E I L</u>	115
I.	Herkunft des Drogenmaterials	115
II.	Allgemeine Arbeitsmethoden	116
II.1	Dünnschichtchromatographie	116
II.1.1	Adsorbentien	116
II.1.2	Laufmittelsystem	116
II.1.3	Detektion	116
II.2	Säulenchromatographie	118
II.2.1	Adsorbens	118
II.2.2	Laufmittel	118
II.2.3	Pack- und Verfahrenstechnik	118
II.3	HPLC	119
II.3.1	Apparative Daten	119
II.3.1.1	Semipräparative HPLC	119
II.3.1.2	Analytische HPLC	119
II.3.2	Trennsysteme	119
II.3.2.1	Analytische HPLC	119
II.3.2.2	Präparative HPLC	120
II.3.2.2.1	Isolierung der Sesquiterpenester	120
II.3.2.2.2	Isolierung der Acetylenverbindungen ..	120
II.4	Physikalisch-chemische Untersuchungen	120
II.4.1	UV-Spektren	120
II.4.2	IR-Spektren	120
II.4.3	Massen-Spektrum	120

II.4.4	¹ H-NMR-Spektren	121
II.4.5	¹³ C-NMR-Spektren	121
II.4.6	Zweidimensionale NMR-Spektren und NOE Spektren	121
II.4.7	Röntgenstrukturanalyse	121
III.	Chemische Verfahren	122
III.1	Hydrolyse	122
III.2	Acetylierung	122
IV.	Spezielle Arbeitsmethoden	123
IV.1	Extraktion	123
IV.1.1	Parthenium integrifolium	123
IV.1.2	Echinacea pallida	123
IV.2	Isolierung der Sesquiterpenester aus Parthenium integrifolium	123
IV.2.1	Isolierung von Ester 1 durch präparative DC	124
IV.2.2	Isolierung von Ester 2a und 2b	124
IV.2.3	Isolierung von Ester 3	125
IV.3	Kristallisationsversuche von Alkohol 1 und 2b	125
V.	Isolierung der Acetylenverbindungen aus Echinacea pallida	126
V.1	Anreicherung durch Säulenchromatographie	126
V.2	Isolierung von Verbindung F durch präparative DC	127
VI.	Physikalische Daten	128
VI.1	Cinnamoyl-echinadiol (Ester 1)	128
VI.2	Cinnamoyl-echinaxanthol (Ester 2a) ...	128
VI.3	Cinnamoyl-epoxyechinadiol (Ester 2b) .	129
VI.4	Cinnamoyl-dihydroxynardol (Ester 3) ..	130
VI.5	8-Hydroxy-tetradecendiinon (Substanz 1)	130
VI.6	8-Hydroxy-pentadecendiinon (Substanz 2)	132
VI.7	8-Hydroxy-pentadecadieninon (Substanz 2')	133
VII.	Röntgenstrukturanalyse	133
VII.1	Echinadiol (Alkohol 1)	133
VII.2	Epoxy-echinadiol (Alkohol 2b)	135
VIII.	Pharmakologische Untersuchungen	137
VIII.1	Carbon-Clearance Test	137
VIII.2	Granulozyten-Test	139
VIII.3	Virushemmende Wirkung	140

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	142
--	-----

A. E i n l e i t u n g

Obwohl Echinacea-Drogen in verschiedenen Präparateformen schon seit langem zur Steigerung der unspezifischen Immunabwehr in der Therapie eingesetzt werden, und bisher über 40 einzelne chemische Verbindungen aus den beiden Pflanzen Echinacea purpurea und Echinacea angustifolia isoliert und identifiziert werden konnten, ist es erst kürzlich gelungen, Polysaccharide mit immunstimulierender Wirkung aus einer der beiden Pflanzen zu erhalten. Diese gut wasserlöslichen Verbindungen vermögen aber die Wirksamkeit der im Handel befindlichen Präparate nur zum Teil zu erklären.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit sollte es daher sein, in den Wurzeln von Echinacea purpurea und Echinacea angustifolia nach weiteren möglichen Wirksubstanzen zu suchen und diese strukturell aufzuklären. Zu untersuchen war außerdem die Frage nach der Drogenidentität, da nämlich Hinweise auftauchten, daß Echinacea purpurea Wurzeln mit Wurzeln von Parthenium integrifolium verfälscht sein könnten. Ähnliche Unklarheiten bestanden auch bei Echinacea angustifolia, für die eine Verwechslung oder Verfälschung mit Echinacea pallida nicht auszuschließen war.

Schließlich sollte diese Arbeit die Grundlage für eine chemische Standardisierung der auf dem Markt befindlichen Drogenpräparate liefern.

B. ALLGEMEINER TEIL

I. Kenntnisstand über Echinacea

I.1 Systematik und Verbreitung

Die zur Familie der Asteraceen zählende Gattung *Echinacea* umfaßt 9 Arten mit 2 Varietäten (Vgl. Tab. 1). Ihre Heimat ist das östliche Nordamerika sowie das Mississippibecken; hier vor allem Arkansas, Oklahoma, Missouri und Kansas (1). Die Pflanzen, die bevorzugt auf trockenem Untergrund wachsen, werden zwischen 40-120 cm hoch und sind klimatisch nicht sehr anspruchsvoll. Sie können ohne weiteres auch in Mitteleuropa angebaut werden (2). Medizinisch verwendet werden *Echinacea angustifolia*, *Echinacea purpurea* und *Echinacea pallida*, auf die wir uns im Nachfolgenden beschränken werden.

Außerdem wurden die Wurzeln von *Parthenium integrifolium* in die Untersuchungen einbezogen, da sich im Verlauf der Untersuchungen herausstellte, daß die im Handel befindlichen *Echinacea purpurea* Wurzeln sehr häufig mit *Parthenium integrifolium* verfälscht sind.

I.2 Botanische Beschreibung

I.2.1 Echinacea angustifolia

Echinacea angustifolia DC., erstmals im Jahre 1836 von DeCANDDOLLE (3) beschrieben, wurde bis zum Anfang dieses Jahrhunderts botanisch unter der Bezeichnung *Brauneria angustifolia* geführt. CRONQUIST (4) stufte 1955 *Echinacea angustifolia* als Varietät von *E. pallida* ein. Erst MCGREGOR (1,5) erkannte in seiner "TAXONOMY OF THE GENUS ECHINACEA" (1968) *Echinacea pallida* und *Echinacea*

Tab 1: Arten und Varietäten der Gattung *Echinacea* nach
McGREGOR (1)

1. *Echinacea purpurea* (L.) Moench
2. *Echinacea angustifolia* DC. var. *angustifolia*
Echinacea angustifolia DC. var. *strigosa* McGregor
3. *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt.
4. *Echinacea atrorubens* (Nutt.) Nutt.
5. *Echinacea paradoxa* (Norton) Britton var. *paradoxa*
Echinacea paradoxa (Norton) Britton var. *neglecta* McGregor
6. *Echinacea laevigata* (Boynton & Beadle) Blake.
7. *Echinacea sanguinea* Nutt.
8. *Echinacea simulata* McGregor
9. *Echinacea tennesseensis* (Beadle) Small

angustifolia als zwei unterschiedliche Arten.

Echinacea angustifolia ist 40 bis 60 cm hoch und ausdauernd. Der einfache, rauhe Stengel ist im einköpfigen, oberen Teil hohl und unter dem Blütenkopf verdickt. Die ganzrandigen, länglich-lanzettlichen bis länglich-elliptischen Blätter sind dreinervig, dunkelgrün, beidseitig rauhaarig und höckerig. Die Grundblätter sind langgestielt, die oberen Stengelblätter kurzgestielt oder fast sitzend. Der Blütenboden ist kegelförmig emporgewölbt, die Hüllblätter lanzettlich, ganzrandig, rauhaarig. Die Spreublätter sind dunkelrot, etwa doppelt so lang wie die Blütenröhre und zusammengezogen, zur Zeit der Samenreife dunkelbraun und steif. Strahlenblüten sind meist zwischen 15 und 20 vorhanden, stets zurückgebogen, etwas hängend, meist zweizählig, blaß purpurfarben bis rosa. Die Röhrenblüten sind zwittrig, grünlich, fünfzählig. Der Griffel ist oben geteilt und dunkelrot. Die Fege-



Abb. 1

Echinacea angustifolia DC.

Abbildung aus "Gathercoal & Wirth" (6)

haare und die Antheren der 5 Staubfäden sind zu einer Röhre verwachsen. Die Pollen sind goldgelb und ca. 28 µm im Durchmesser. Der Pappus besteht am Grund der Blütenröhre aus einem unregelmäßig gezackten Saum. Die Frucht ist eine einsamige Schließfrucht ohne Nährgewebe. Der Samen ist hellbraun und vierkantig. Die Wurzeln bestehen aus einer mehr oder weniger starken, senkrecht in den Boden gehenden Pfahlwurzel. Die Rinde ist weniger als 1 mm dick, das Holz zusammengesetzt aus abwechselnd dunkleren und helleren Zellreihen. Die getrocknete und im Herbst gesammelte Wurzel (Handelsware) ist fast ohne Geruch, von schwach aromatischem, anfangs süßem, später scharfem, bitterem und speichelziehendem Geschmack. Das Kraut besitzt einen unspezifischen Geruch und Geschmack. Im mikroskopischen Bild der Wurzeldroge ist das Vorkommen von schizogenen Ölbehältern und Harzräumen charakteristisch. Daneben sind langgestreckte Steinzellen, die in eine melanogene Schicht eingebettet sind, typisch (Abb. 1).

1.2.2 Echinacea pallida

Der einfache, kaum verzweigte Stengel der 40-120 cm hohen Pflanzen ist, unten spärlich, oben dichter behaart; die Form der dunkelgrünen, ganzrandigen Blätter variiert von länglich-lanzettlich bis länglich-elliptisch. Sie sind dreinervig und beidseitig behaart. Die stengelständigen Blätter sind unten kurzgestielt, oben eher sitzend (Länge: 10-25 cm, Breite: 1-2.5 cm).

Die wimperig behaarten Hüllblätter sind von lanzettlicher bis schmal länglicher Form, 8-17 mm lang und 2-4 mm breit. Sie sind in 3-4 Wirteln angeordnet, die allmählich in die Zungenblüten übergehen. Die Zungenblüten sind zurückgebogen, 4-9 cm lang, 5-8 mm breit, purpurrot, lila oder weiß. Eine Röhrenblüte ist 10-13 mm lang; davon entfallen 2.5-3.5 mm auf die Granne.

Die Scheibenblüten sind 8-10 mm, die Blütenblätter 2-3 mm lang. *Echinacea pallida* bildet kahle, 3.7-5 mm lange Achänen, die einen gleichmäßig gezähnten, kronenförmig angeordneten, etwa 1mm hohen Pappus tragen. Die Pollenkörner sind weiß, 24-28.5 μ m im Durchmesser. Die Chromosomenzahl ist $n=22$.

Echinacea pallida ist verbreitet in den nördlichen Staaten der USA : Indiana, Illinois, Iowa, Missouri, und Arkansas (Abb. 2).

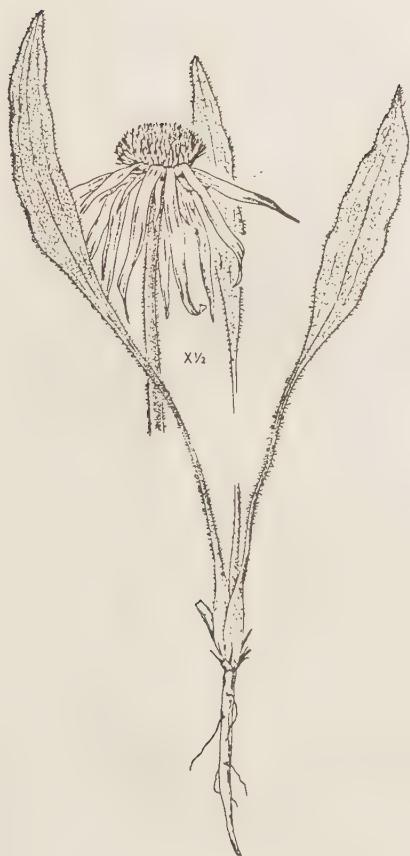


Abb. 2

Echinacea pallida NUTT.

Habituszeichnung aus "New Britton & Brown, Illustrated
Flora of the North-Eastern United states and adjacent
Canada" (63)

I.2.3 Echinacea purpurea

Echinacea purpurea wurde erstmals im Jahre 1699 von MORRISON (7) unter den Namen Dranunculus virginianus latifolius botanisch beschrieben. Später wurde sie als Chrysanthemum americanum (L. Plunkett, 1720)(8), Rudbeckia purpurea (Linnaeus, 1753) (9) und Brauneria purpurea (N.J de Necker, 1790)(10) bezeichnet, bevor ihr 1794 CONRAD MOENCH (11) den Namen *Echinacea purpurea* gab, der bis in die heutige Zeit Gültigkeit besitzt.

In Europa ist sie bekannt unter den Namen "purpurfarbene Kegelblume", "purpurfarbener Igelkopf" und "purpurfarbener Sonnenhut". Verbreitet ist die Pflanze in den mittleren und östlichen Staaten der USA, vor allem im nördlichen Teil der Mississippi-Ohio-Tennessee-Region, wobei sie als Standort Prärien und die trockenen Abhänge sommergrüner Laubwälder bevorzugt (12). Kultiviert wird sie heute in den USA, in der Sowjetunion und in Mitteleuropa (13,14).

Echinacea purpurea stellt ein krautiges, mehrjähriges, fast kahles Staudengewächs dar, das eine Höhe von 60-150 cm erreicht. Der Stamm ist bis zum oberen Drittel rund, während die jüngeren Teile kantig und filzig behaart sind. Die breiten, ovalen Grundblätter sind wechselständig, gelegentlich auch gegenständig angeordnet und bilden am Grund der Pflanze einen oft bis zu 35 cm hohen Kranz. In ihrer Form sind sie spitz zulaufend, am Rande in großen Abständen gezähnt. Die Grundblätter sind im allgemeinen 6-9 cm breit und 20 cm lang. Sie besitzen einen langen, rötlichen Stiel, werden von 5 Längsnerven durchzogen und sind auf beiden Seiten filzig behaart.



Abb. 3

Echinacea purpurea (L.) Moench

Habituszeichnung aus "New Britton & Brown, Illustrates
Flora of the North-Eastern United states and Adjaacent
Canada" (63)

Die Stengelblätter sind lanzettlich bis schmallanzettlich, ebenfalls stark rauh-filzig, kräftig gestielt und vorwiegend wechselständig angeordnet. Sie sind ca. 13 cm lang, 7-8 cm breit und von 3 Längsnerven durchzogen.

Die Pseudanthien sind zunächst fast flach, später leicht aufgewölbt. Im Stadium des Verblühens erfolgt eine weitere Vergrößerung des Blütenbodens durch die Ausbildung einer starken, kegelförmigen Wölbung. Die Sammelblüten haben einen Durchmesser von 10-15 cm. Die purpurfarbenen, zwittrigen, fünfzähligen, 0,5-0,6 cm langen Röhrenblüten werden von orangeroten, am Ende dunkelroten, spitz zulaufenden Spreuschuppen überragt. Die 12 bis 20 ebenfalls purpurfarbenen, mehr oder weniger zurückgeschlagenen Zungenblüten sind schmal-lineal, 4-6 cm lang und 0,6 cm breit. Die Sammelblüte wird von drei- oder vierzähligen, lineal lanzettlich, behaarten Hüllblättern umgeben (Abb. 3).

Durch die Verzweigung eines senkrechten Rhizoms bildet sich ein mehrköpfiger, kurzer Wurzelstock mit zahlreichen, verhältnismäßig tiefgehenden, weißlich-hellbraunen, dünnen Wurzeln (2).

I.3 Medizinische Anwendung

I.3.1 Geschichtliches

Im Jahre 1852 wurde die Wurzel von *Rudbeckia purpurea* (*Echinacea purpurea*) durch KING (15) als Heilmittel gegen Syphilis erstmals in der medizinischen Literatur erwähnt. Zur selben Zeit berichtete Dr. A.CLAPP über die Verwendung von *Echinaceae purpureae radix* in der Volksmedizin als Karminativum und Aromatikum (16).

Echinacea angustifolia wurde in die neuzeitliche Medizin im Jahre 1885 durch Dr. Meyer (18) eingeführt, der ihre Anwendung von Indianern erfahren hatte. Er verwendete *Echinacea angustifolia* Wurzel zunächst ohne jegliche botanische Identifizierung, neben Hopfen und Wurmwurzel in seiner Spezialität "Meyer's Blood Purifier". Als Indikationen postulierte er Rheumatismus, Kopfschmerzen, Schwindel, Dyspepsien, schlecht heilende Wunden und Schlangenbisse.

Nach ihrer Identifizierung als *Echinaceae angustifoliae radix* beschrieb Meyer (19) die Droge u.a. als Antisepikum, Tumor-, Wundheilungs- und Fieber-Therapeutikum. 1887 stellten die Lloyd Brothers (17) Extrakte für die medizinische Anwendung her. KING (20) konnte für *Echinacea*-Tinkturen eine palliative Wirksamkeit bei einer Krebserkrankung feststellen. Gegen Ende des letzten Jahrhunderts berichtete Lloyd (21) von der Einführung der *Echinacea*-Droge in die Therapie in Nordamerika.

In Europa wurde *Echinacea purpurea* zwar bereits im Jahre 1787 von SCHÖPF (22) und 1831 von DIERBACH (23) als Pflanze mit möglicher Heilwirkung erwähnt. Seit Anfang

dieses Jahrhunderts werden Extrakte aus *Echinacea* in Europa aber erst therapeutisch verwendet, wobei insbesondere *Echinacea purpurea* (L.) Moench., *Echinacea angustifolia* DC. und *Echinacea pallida* Nutt., zur Anwendung kommen.

I.3.2 Derzeitige Anwendung

Extrakte aus *Echinacea*-Arten sind laut Stoffliste der ABDA (143) zur Zeit in 135 Arzneipräparaten enthalten, wobei die Mehrzahl Kombinationen mit anderen Pflanzenextrakten darstellen.

Als Indikationen gelten grippale Infekte, fieberhafte Zustände, chronische Erkrankungen mit mangelnder körpereigener Abwehrreaktion und chronische Polyarthritiden (24-31). Außerdem werden *Echinacea*-Extrakte in der Kinderheilkunde (32,33), in der Urologie (34-36) und bei Hauterkrankungen (37-42) eingesetzt. Die nachfolgenden Tabellen 2 und 3 geben einen Überblick über die Präparate, in denen *Echinacea angustifolia* und *Echinacea purpurea* Wurzelextrakte enthalten sind. Nicht berücksichtigt wurden Zubereitungen, die homöopathische Urtinkturen oder Verdünnungen enthalten.

Tab. 2: Präparate mit *Echinacea angustifolia* Wurzelextrakt

Präparate	Firma	Anwendung
Acalon Tropfen	Arzn. Hüls	Immunstimulans
Angocin Dragees	Repha	Antimikrobiotikum
Bagnisan, S Bad	Klemenzen	Balneotherapeutikum
Cefaktivon Ampullen, Tropfen	Cefak	Immunstimulans
Cefaktivon "novum"	Cefak	Immunstimulans
Cholamapain Dragees	Jura	Cholagogum
Echinacea Aar Dragees	AAR Pharma	Immunstimulans
Erkältungstee Natur- waren Tee	Naturwaren	
Esberitox Tabletten, Tropfen, Ampullen, Suppositorien	Schaper u. Brümmer	Immunstimulans
Eibiosept Tropfen	Fridrich Kremer jr.	Immunstimulans
Pascotox forte Injektopen, Ampullen,	Pascoe	Immunstimulans
Pascotox Tabletten, Tropfen	Pascoe	Immunstimulans
Mederma Dragees	Merz	Dermatikum
Noricavan Dragees	Bionorica	
Prosta Kapseln	Fink	Urologikum
Prosta-Liquidum	Fink	Urologikum
Rutacutin Salbe	Rutanol	
Septonsil Tropfen	Pekana	Mund- u. Rachen- therapeutikum
Sirmia Echinacea Alterstonikum	Niedermeier	Roborans
Sirmia Kürbissamen- Tonikum	Niedermeier	
Uroflux Tee	Nattermann	Diuretikum
Venendragees	Schuck	Venenmittel
Verintex Tropfen	Pekana	Dermatikum

Tab. 3: Präparate mit Echinacea purpurea Wurzelextrakt

Präparate	Firma	Anwendung
Bronchoforton Saft, Tropfen	Plantorgan	Antitussivum
Carito Kapseln	Hoyer	Urologikum
Cycloven Dragees, Salbe Suppositorien, Tropfen	Tempelhof	Venenmittel
Esberitox Tabletten, Tropfen, Amp., Suppositorien	Schaper u. Brümmer	Immunstimulans
Eupatal Sirup, Tropfen	Madaus	Antitussivum
Galleb forte Kapseln	Hoyer	Cholagogum
Galleb Liquidum	Hoyer	Cholagogum
Mederma Akne-Dragees	Merz	Dermatikum
Mutanoma Kapseln	Intermut	
Nieron Kapseln	Hoyer	Urologikum
Nieron liquidum	Hoyer	Urologikum
Nomon Kapseln	Hoyer	Urologikum

I.4 Bisher bekannte Inhaltsstoffe von Echinacea

angustifolia und Echinacea purpurea

Eine umfangreiche phytochemische Literatur beschäftigt sich mit der Identifizierung der Echinacea-Inhaltsstoffe. Die Tabellen 4 und 5 geben Aufschluß über die Vielzahl der Verbindungen, die bisher aus der Wurzel (W) und dem Kraut (K) von Echinacea angustifolia und Echinacea purpurea isoliert werden konnten.

Tab 4: Inhaltsstoffe aus Echinacea angustifolia

Inulin, Pentosane, reduzierende Zucker (W)	43
Ölsäure, Linolsäure, Cerotinsäure, Palmitinsäure (W)	44
β -Sitosterol, Sitosterol-3 β -D- glucosid, Stigmasterol (K)	45
Behensäureethylester (W), Triacon- tanol (K), n-Alkane (K)	45
Ätherisches Öl mit Geranioliso- butyrat, -acetat, -propionat, 2- Undecanon und Humulen (W)	45,46
Echinacein (W)	48
Isobutylamide mit Dien-diin- Struktur und Isobutylamide von 2,4,8,10-Dodecatetraensäuren (W)	49
Isobutylamide der trans-trans- Dodecadien-(2,4)-säure und der all- trans-Decatrien-(2,4,6)-säure (W)	45
Polyacetylene (W,K), 8-Pentadecen- 2-on (W), (Z)-1,8-Pentadecadien	50,51
Echinolon (=E)-10-Hydroxy-(4,10)- dimethyl-dodecadien-(4,11)-on-2) (W)	51
Echinacosid (W)	52,53
Cichoriensäure, Cichoriensäure- methylester, 2,3-Diferuloyl-wein- säure, 2-Caffeoyl-3-feruloyl-wein- säure, Kaffeesäure, Kaffeesäuremethyl- ester (W,K)	54
Luteolin, Kämpferol, Quercetin, Quercetin-7-glucosid, Luteolin-7- glucosid, Kämpferol-3-glucosid, Quercetin-3-arabinosid, Quercetin-3- galaktosid, Quercetin-3-xylosid, Quercetin-3-glucosid, Kämpferol-3- rutosid, Rutin, Isorhamnetin-3- rutosid sowie 3 Diglucoside (K)	55
Tussilagin, Isotussilagin (K,W)	56
Polysaccharide (K,W)	57,58

Tab. 5: Inhaltsstoffe aus *Echinacea purpurea*

Inulin, Pentosane, reduzierende Zucker (W)	43
Ölsäure, Linolsäure, Cerotinsäure, Palmitinsäure (W)	44
Ätherisches Öl mit β -Caryophyllen, Caryophyllen-epoxid, Humulen, α -Pinen, β -Myrcen, Limonen, p-Cymol, Thujon und Farnesol (W)	45,46,59
Isobutylamide mit Dien-diin-Struktur und Isobutylamide von 2,4,8,10-Dodecatetraensäuren (W)	58
Polyacetylene (W,K)	49
Ascorbinsäure (K)	60
Cichoriensäure, Cichoriensäuremethylester, 2,3-Diferuloylweinsäure, 2-Caffeoyl-3-feruloylweinsäure, Kaffeesäure, Kaffeesäuremethylester (W,K)	54
Quercetin, Quercetin-3-glucosid, Kämpferol-3-monoglucosid, Quercetin-7-glucosid, Rutin, Quercetin-3-robinobiosid, Kämpferol-3-rutinosid, Quercetin-3-xylosylgalaktosid, sowie weitere Diglucoside des Isorhamnetins (K)	55
Tussilagin, Isotussilagin (K,W)	56
Polysaccharide (K, W)	57,58

I.5 Bisherige phytochemische und pharmakologische
Untersuchungen von Echinacea purpurea und
Echinacea angustifolia

I.5.1 Echinacea purpurea

Seit Anfang der Vierziger Jahre wird in der Literatur von pharmakologischen Untersuchungen mit Echinacea-Extrakten berichtet.

Nach Ufer (61), Koch (62), Albus und Hering (12) sowie Griesbert (13) führt die lokale Applikation von Echinacin^R (Preßsaft von Echinacea purpurea Herba) bei Infektionen der Haut sowie eitrigen Verletzungen zu einer schnelleren Regenerierung des Gewebes.

Büsing (14), Koch und Mitarb. (66,67) und Korting und Mitarb. (68) berichteten von einer Hyaluronidase-Hemmung durch Echinacin^R. Diese Wirkung wird als mitverantwortlich für eine Erhöhung der Abwehrkräfte des Organismus bei Infektionen genannt. Über eine indirekte Einwirkung auf das Hyaluronsäure-Hyaluronidase-System als Folge einer verstärkten Fibroblasten-Vermehrung berichteten Koch (69), Kuhn (70), Tünnerhoff und Schwabe (71) sowie Vogel und Mitarb. (72).

Weitere Veröffentlichungen von Koch und Übel (67), Tonutti (73-75), Lützenkirchen (76) sowie Mostbeck und Studler (77) berichten über den Einfluß von Echinacin^R auf das Nebennierenrinden-Hypophysen-System. Alle Autoren schrieben der Droge auf Grund ihrer Untersuchungen eine cortisonähnliche Wirkung zu.

Chone (78,79) berichtete über die positive Beeinflussung der Leukozyten-Kinetik durch Echinacin^R. Bittner (80) befaßte sich, ebenso wie Kuhn (70), mit der Phagozytose-stimulierenden Wirkung der Pflanze. Diese konnte er mit Hilfe des Carbon-Clearance-Testes nachweisen. Zudem wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß ein Extrakt von *Echinacea purpurea* die hemmende Wirkung bestimmter Antibiotika auf die Aktivität des Reticuloendothelialen Systems abschwächt.

Orzechowski (81,82) schrieb dem Pflanzenpreßsaft aus *Echinacea purpurea* eine, die körpereigene Abwehr steigende, Wirkung zu. Im Jahre 1971 berichteten Bonadeo und Mitarb. (83) über die Isolierung und pharmakologische Untersuchung von Polysaccharide enthaltenden Fraktionen aus *Echinacea angustifolia* und *Echinacea purpurea*.

Nach Wacker (84,85) besitzen der Preßsaft aus den oberirdischen Pflanzenteilen sowie der methanolische und wäßrige Extrakt aus den Wurzeln von *Echinacea purpurea* eine antivirale Wirkung, wenn die Zellkulturen mindestens vier bis sechs Stunden vor der Infizierung durch den Virus mit dem Extrakt bebrütet worden waren. Es war jedoch auch hier, wie in allen anderen Fällen, nicht gelungen, die Wirkung einer bestimmten Substanz zuzuordnen.

Nach Neugebauer (59) sollte die wichtigste physiologisch aktive Komponente von *Echinacea purpurea* im etherischen Öl enthalten sein. Das etherische Öl zeigte in einem Blutkoagulationstest andererseits die gleiche Wirkung

wie ein alkoholischer Extrakt. Auch Nikol'skoya (89) berichtete von einer blutgerinnungsfördernden und weiter von einer wundheilungsfördernden Aktivität von *Echinacea purpurea*.

I.5.2 *Echinacea angustifolia* und *Echinacea pallida*

Stoll und Mitarbeiter (87) isolierten Echinacosid aus den Wurzeln von *Echinacea angustifolia* und beschrieben dafür eine antibakterielle Aktivität gegen *Staphylokokkus aureus* und *Streptokokken*.

Voaden und Mitarb. (88) fanden eine Substanz (1,8-Pentadecadien) im etherischen Öl der Wurzeln von *Echinacea angustifolia* und *Echinacea pallida*, die im Tumor-Inhibitions-Test aktiv war. Martin (89) isolierte einen Inhaltsstoff (N-Isobutyl-trans-2, cis-6, trans-8, trans-10-dodecatetraencarboxamid), der insektizide Eigenschaften besaß. Martin (90) identifizierte 1975 die Verbindung Echinolon, die als Insekten-Wachstumsfaktor wirkte. Für die von Wagner und Proksch gefundenen Polysaccharide wurden immunstimulierende Wirkungen auf Granulozyten und Makrophagen nachgewiesen (64).

II. Kenntnisstand über Parthenium integrifolium, eine Verfälschung von Echinacea purpurea Drogen

II.1 Verbreitung und Botanik

Im Vergleich zu der großen volksmedizinischen und wissenschaftlichen Bedeutung der verschiedenen Echinacea-Arten, die sich in einer umfangreichen Literatur dokumentiert, hat Parthenium integrifolium bisher relativ wenig Beachtung gefunden. Da sich jedoch bei unseren Untersuchungen an Echinacea purpurea Wurzeln zeigte, daß ein Großteil der Handelsware mit Parthenium integrifolium verfälscht war, wurde diese Droge ebenfalls in unsere Arbeit einbezogen.

Die in Nordamerika beheimatete Gattung Parthenium gehört, ebenso wie Echinacea, zur Familie der Asteraceen. Bei Parthenium integrifolium (Abb. 4) handelt es sich um eine ausdauernde Pflanze mit einer knotig verdickten, in der Regel kurzen Wurzel mit anhängenden feinen Fadenwurzeln. Der 50-100 cm hohe Stengel ist einfach oder oben verzweigt. Er kann oben borstig behaart und unten kahl, oder in der ganzen Länge zottig behaart sein. Übergänge kommen vor. Die großen, manchmal nicht sehr zahlreichen Blätter sind gekerbt bis gezahnt, oberseitig rau bis kugelförmig uneben, manchmal entlang der Mittelrippe und der Hauptnerven behaart. Die Blattunterseite kann etwas uneben und behaart sein. Die Grundblätter sind langgestielt, lanzettlich-elliptisch bis breit eiförmig und normalerweise 7-20 cm lang und 4-10 cm breit. Die Stengelblätter sind nach oben hin kürzer gestielt und generell kleiner, die oberen oft sitzend.



Abb. 5:

Parthenium integrifolium L.

Habituszeichnung aus "New Britton & Brown, Illustrated
Flora of the North-Eastern United States and adjacent
Canada" (65)

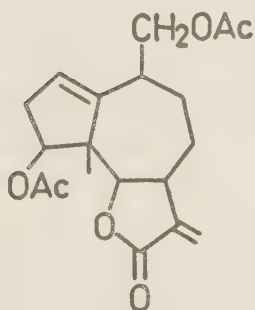
Die Blütenköpfchen (Durchmesser 4-7 mm) bilden einen oben flachen bis leicht gewölbten Blütenstand. Die Strahlenblüten sind knapp 2 mm lang, weißlich bis weiß. Die verkehrt eirunden Schließfrüchte mit verwachsener Frucht- und Samenschale sind von schwarzer Farbe und etwa 3 mm lang (95).

II.2 Volksmedizinische Anwendung

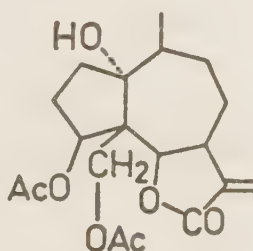
Das Kraut von *Parthenium integrifolium* wurde in der Volksmedizin gegen Malaria und als Diuretikum verwendet (91), weshalb man *Parthenium* auch "Wild Quinine" nannte. Zusätzlich wurde von insektiziden (92), antimikrobiellen (93) und antitumoralen (94) Eigenschaften berichtet. Nach den letzten Untersuchungen besitzt *Parthenium integrifolium* kontaktallergische Wirkung (95).

II.3 Bisher bekannte Inhaltsstoffe

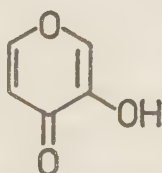
Parthenium integrifolium ist bisher Gegenstand nur weniger phytochemischer Untersuchungen gewesen. Yoshioka und Mitarb. (100) isolierten aus den oberirdischen Teilen die beiden Sesquiterpenlactone Tetraneurin-E (a) und Tetraneurin-C (b). Herz (96) konnte diese Verbindungen nicht finden und beschrieb das Vorkommen von Pyromeconsäure (3-Hydroxy-4H-pyran-4-on) (c). Bisherige Untersuchungen zeigten, daß die 15-oxygenierte Methylgruppe typisch für die Sesquiterpen-(Pseudoguaianolid-lactone) von *Parthenium* (97-102) ist (Abb. 5).



Tetraneurin-E



Tetraneurin-C



Pyromeconsäure

Abb. 5: Bisher bekannte Inhaltsstoffe von *Parthenium integrifolium*

C. S P E Z I E L L E R T E I L

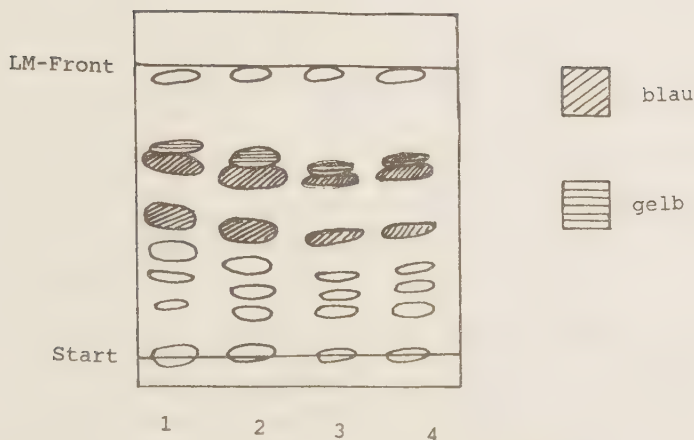
III. Isolierung von neuen Terpenen aus Parthenium integrifolium

Zu Beginn der Arbeit war die Identität der als Echinacea purpurea deklarierten Wurzel Droge des Handels mit Parthenium integrifolium noch nicht bekannt. Erst nachdem die Isolierungen bereits abgeschlossen waren, stellte sich die wahre Identität der Droge heraus.

III.1 Orientierende Dünnschichtchromatographie

Um einen Überblick über die verschiedenen in der Droge vorliegenden Stoffklassen zu erhalten, wurden die Wurzeln von Parthenium integrifolium mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert, dünnschichtchromatographisch untersucht und mit verschiedenen Detektionsmitteln behandelt.

Es zeigte sich, daß mit Vanillin/Schwefelsäure in allen Extrakten drei charakteristische Zonen nachweisbar waren, die sich blau bzw. gelb anfärbten und vermutlich von terpenoiden Verbindungen stammten (Abb. 6). Die beste Anreicherung dieser Verbindungen erhielten wir im Chloroform- und Hexan-Extrakt. Das Laufmittel Toluol/Ethylacetat (7:3) war für die DC am besten geeignet, wobei drei Zonen zwischen R_f 0,3 und 0,6 auftraten. Alle drei Zonen ergaben eine Fluoreszenzminderung im UV 254 nm (Abb. 7).



1 - Hexanextrakt

2 - Chloroformextrakt

3 - Ethylacetatextrakt

4 - Methanolextrakt

LM : Chloroform : Methanol

100

1

Detektion :

Vanillin-Schwefelsäure

Abb. 6: Dünnschichtchromatogramm der verschiedenen
Extrakte von *Parthenium integrifolium*

Zur Optimierung des DC-Laufmittels wurden verschiedene Lösungsmittelkombinationen getestet (Abb. 8). Es zeigte sich, daß beim Wechsel von Toluol-Ethylacetat-haltigen Fließmitteln zu Chloroform-Methanol eine Umkehr der Elutionsreihenfolge der Zonen auftrat. Die gelbe Zone wurde im letztgenannten System als erste eluiert. Als am geeignetsten erwiesen sich die Fließmittelgemische Toluol:Ethylacetat 7:3 und 19:4.

Außer mit Godin-Reagenz ließen sich die Hauptzonen, welche wir Ester 1, Ester 2 und Ester 3 nannten, mit Ehrlichs-Reagenz (p-Dimethylaminobenzaldehyd/HCl), Antimon-III-chlorid Lsg. (20%ig in EtOH), Essigsäureanhydrid/Schwefelsäure (je 10%ig in EtOH) und Liebermann Burchard-Reagenz anfärben (vgl. Tab. 6). Mit EP-Reagenz (105) konnte eine blaue Färbung erzielt werden, die als Hinweis auf guajan- bzw. azulenähnliche Verbindungen gilt. Ammoniakdampf und Dragendorffs Reagenz erwiesen sich zur Detektion als ungeeignet. Antimon-III-chlorid und Liebermann-Burchard-Reagenz werden laut Stahl (104) zur Detektion von Triterpenen und Steroiden eingesetzt. Godins Reagenz ergibt mit einer Vielzahl hoch- und niedermolekularer Terpene positive Reaktionen.

Tab. 6: Farben der Hauptverbindungen bei verschiedenen Detektionsmitteln

Reagenz	Färbungen nach Detektion (vis)		
	Ester		
	1	2	3
Godin-Reagenz	blau	gelb	blau
Vanillin/Phosphorsäure	blau	orange-gelb	blau
Ehrlichs-Reagenz	violett	rosa	violett
Liebermann-Burchard Reagenz	grau-braun	grün-braun	grau-braun
EP-Reagenz	blau	rot-violett	blau
Antimon-III-chlorid (UV 365 nm)	-- sehr stark rosafarben --		

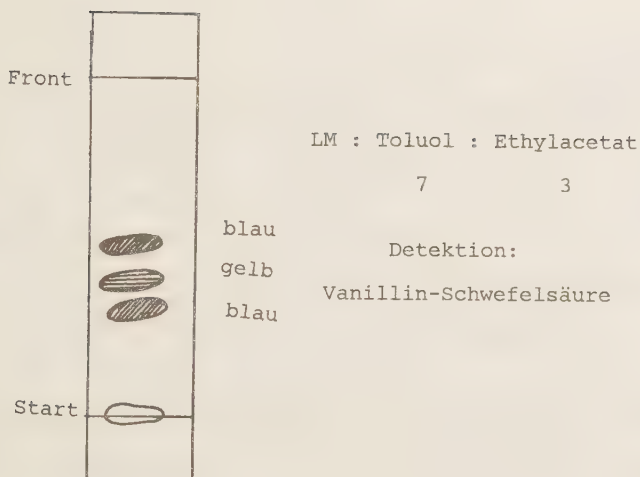
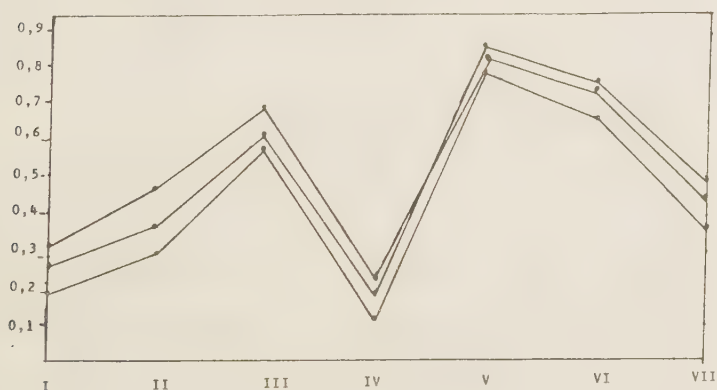


Abb. 7: DC-Trennung der Hauptsubstanzen von *Parthenium integrifolium*



LM I	Toluol : Ethylacetat	19 : 4	(103)
LM II	Toluol : Ethylacetat	7 : 3	
LM III	Toluol : Ethylacetat	6 : 5	
LM IV	Toluol : Ethylacetat	93 : 7	
LM V	Chloroform : Methanol	20 : 1	
LM VI	Chloroform : Methanol	50 : 1	
LM VII	Chloroform : Methanol	100 : 1	

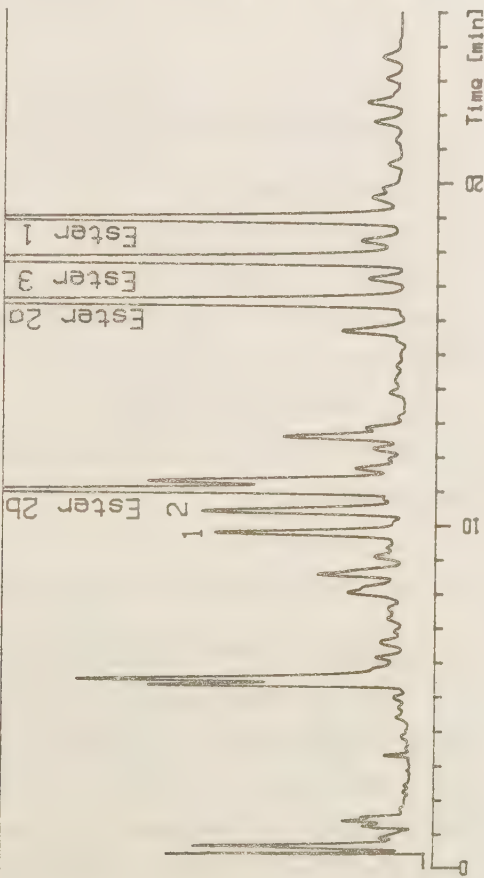
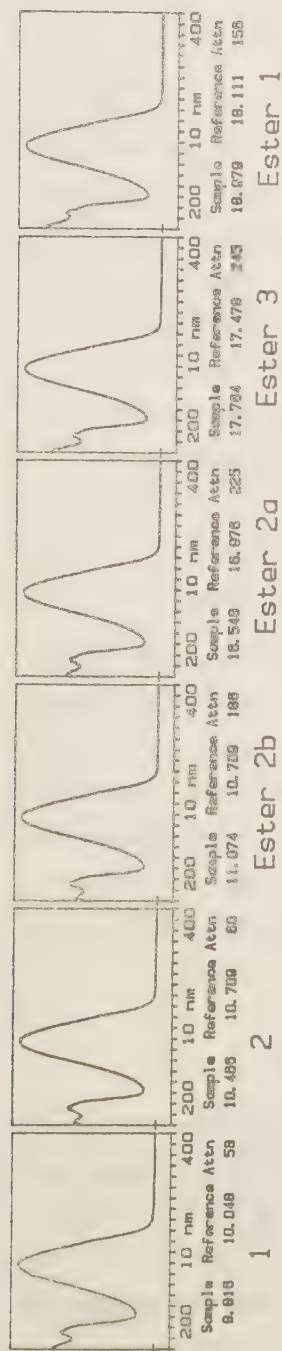
Abb. 8: DC-Trennung der drei Hauptzonen des Chloroformextraktes von *Parthenium integrifolium*

III.2 Voruntersuchungen mit HPLC

Die Auftrennung des Chloroformextraktes mittels analytischer HPLC erfolgte auf einer "reversed-phase" Säule (Lichrospher RP 18). Die Verwendung eines Acetonitril-Wasser Gradientensystems von 40-80% Acetonitril ergab eine gute Auftrennung der enthaltenen Substanzen. Das HPL-Chromatogramm zeigte vier Hauptpeaks mit den Retentionszeiten 11, 16, 17 und 18 Minuten (vgl. Abb. 9). Durch Detektion mit Hilfe eines Photodiodenarray-Detektors erhielten wir on-line die UV-Spektren aller Peaks. Die UV-Spektren aller Hauptverbindungen zeigten das gleiche Absorptionsprofil. Sie ließen ein konjugiertes System erkennen. Die Spektren erwiesen sich mit dem der Zimtsäure als nahezu deckungsgleich.

III.3 Extraktion

500 g Wurzelpulver von *Parthenium integrifolium* wurde nacheinander mit Hexan, Chloroform, Ethylacetat und Methanol jeweils 24 Stunden in einer Soxhletapparatur extrahiert. Nach Einengen des Chloroformextraktes verblieben 22 g eines öligen Rückstandes. Nach Einengen der Hexan-, Ethylacetat-, und Methanolextrakte wurden 16 g, 14 g, bzw. 18 g erhalten.



inj. vol. 5 μ l
 mobile ph. A: water
 " B: acetonitril
 " 40%B - 80%B in 30min
 " 1.0 ml/min
 stat. ph. LiChrospher RP18, 5 μ m
 column Hibar 125-4
 run no. 495
 Inj. Time 13:25
 Attn (AUD) 120.0 (215.4)
 Zero% 2%
 Signal: D: 4.0 Set 0

Wavelengths
 1. 210, 4
 2. 230, 4
 3. 254, 4
 4. 280, 4
 5. 280, 4
 6. 320, 20
 7. 450, 50
 8. 550, 100

Abb. 9: HPLC-Fingerprint von Parthenium integrifolium Wurzel

III.4 Säulenchromatographie

Zur Anreicherung der Hauptsubstanzen wurde der Chloroformextrakt mit einer Kieselgel-Säule aufgetrennt. Toluol:Ethylacetat (19:4) erwies sich dabei als geeignetes Laufmittel. 12 g Extrakt wurden mit einer mit 200 g Kieselgel gepackten Säule in drei grobe Fraktionen getrennt. Im einzelnen ergaben sich folgende Ausbeuten:

Fraktion I	98 mg	angereicherte Verbindung 1
Fraktion II	72 mg	angereicherte Verbindung 2
Fraktion III	90 mg	angereicherte Verbindung 3

III.5 Präparative Dünnschichtchromatographie

Die Reinigung der drei Fraktionen erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie im Laufmittel Toluol-Ethylacetat (7:3). Die Zonen wurden im UV 254 nm markiert und von der Platte abgenommen. Die Substanzen wurden mit Chloroform eluiert und die Lösung membranfiltriert. Auf diese Weise konnten wir 40 mg Verbindung 1, 30 mg Verbindung 2 und 30 mg Verbindung 3 in DC-reiner Form erhalten.

III.6 Reinheitsprüfung der Substanzen

Für die Reinheitsprüfung der Substanzen verwendeten wir das von der Untersuchung des Chloroformextraktes bekannte HPLC-System. Verbindung 1 besaß bereits eine für die Spektroskopie ausreichende Reinheit von 95% .

Die Prüfung von Verbindung 2 im gleichen System zeigte zwei Peaks etwa gleicher Intensität (Retentionszeiten 11

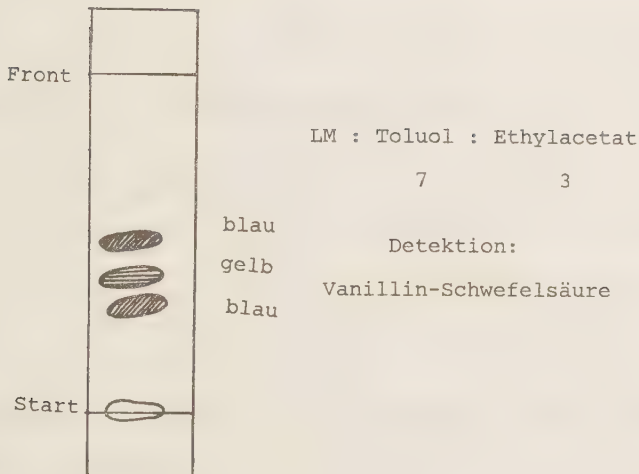
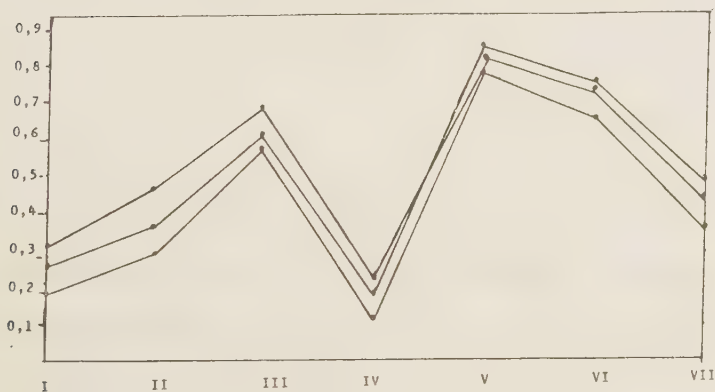


Abb. 7: DC-Trennung der Hauptsubstanzen von *Parthenium integrifolium*



LM I	Toluol : Ethylacetat	19 : 4	(103)
LM II	Toluol : Ethylacetat	7 : 3	
LM III	Toluol : Ethylacetat	6 : 5	
LM IV	Toluol : Ethylacetat	93 : 7	
LM V	Chloroform : Methanol	20 : 1	
LM VI	Chloroform : Methanol	50 : 1	
LM VII	Chloroform : Methanol	100 : 1	

Abb. 8: DC-Trennung der drei Hauptzonen des Chloroformextraktes von *Parthenium integrifolium*

III.2 Voruntersuchungen mit HPLC

Die Auftrennung des Chloroformextraktes mittels analytischer HPLC erfolgte auf einer "reversed-phase" Säule (Lichrospher RP 18). Die Verwendung eines Acetonitril-Wasser Gradientensystems von 40-80% Acetonitril ergab eine gute Auftrennung der enthaltenen Substanzen. Das HPL-Chromatogramm zeigte vier Hauptpeaks mit den Retentionszeiten 11, 16, 17 und 18 Minuten (vgl. Abb. 9). Durch Detektion mit Hilfe eines Photodiodenarray-Detektors erhielten wir on-line die UV-Spektren aller Peaks. Die UV-Spektren aller Hauptverbindungen zeigten das gleiche Absorptionsprofil. Sie ließen ein konjugiertes System erkennen. Die Spektren erwiesen sich mit dem der Zimtsäure als nahezu deckungsgleich.

III.3 Extraktion

500 g Wurzelpulver von *Parthenium integrifolium* wurde nacheinander mit Hexan, Chloroform, Ethylacetat und Methanol jeweils 24 Stunden in einer Soxhletapparatur extrahiert. Nach Einengen des Chloroformextraktes verblieben 22 g eines öligen Rückstandes. Nach Einengen der Hexan-, Ethylacetat-, und Methanolextrakte wurden 16 g, 14 g, bzw. 18 g erhalten.

bzw. 16 min.). Um das Laufverhalten dieser beiden Substanzen auf der DC zu klären, fingen wir jeweils eine kleine Menge auf. Bei der DC Prüfung zeigten beide Substanzen in allen verwendeten LM den gleichen Rf-Wert. Somit war klar, daß die Verbindung von Zone 2 in Wirklichkeit aus zwei verschiedenen Verbindungen bestand, denen in der HPLC die Peaks der Retentionszeiten 16' (Substanz 2a) und 11' (Substanz 2b) zuzuordnen waren. Verbindung 3 zeigte eine Retentionszeit von 17' und besaß noch keine ausreichende Reinheit.

III.7 Präparative HPLC

Die Substanzen 2a, 2b und 3 konnten wir durch semipräparative HPLC an einer "reversed phase" Säule rein darstellen. Als Fließmittel verwendeten wir 80% Acetonitril/Wasser. Pro Injektion konnten so etwa 1,5 mg Substanz in einem Zeitraum von ca. 40 Min. chromatographiert werden. Nach Beendigung von 65 Durchgängen erhielten wir auf diese Weise 13 mg Substanz 2a, 15mg 2b und 20 mg Substanz 3.

IV. Strukturaufklärung der Verbindungen 1, 2a, 2b, 3

IV.1 Identifizierung der Säurekomponente

Die mittels Photodiodenarray aufgenommenen UV-Spektren der Ester wiesen ein Maximum bei 280 nm auf und besaßen Ähnlichkeit mit dem der Zimtsäure (Abb.11). Die IR-Spektren der vier Substanzen enthielten charakteristische Absorptionsbanden bei 3450cm^{-1} , 1710 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 730 cm^{-1} und 770 cm^{-1} , die für die Anwesenheit freier OH-Gruppen, sowie einer Estergruppierung und eines aromatischen Molekülteiles sprachen (Abb. 12).

Die 80 MHz ^1H -NMR-Spektren aller vier Verbindungen zeigten übereinstimmend charakteristische Signale im Bereich von 6-8 ppm (Abb. 13), die ebenfalls der Zimtsäure zugeordnet werden konnten (106). Die Spektren der Ester unterschieden sich lediglich im Bereich des höheren Feldes (1-6 ppm).

Dieselbe Information erhielten wir aus den Massenspektren. Die Intensität des Fragments m/z 131 (100%) war ein Beweis für die Anwesenheit von Zimtsäure. Schließlich konnten wir nach Hydrolyse der Ester (10%-ige methanolische Kalilauge) mittels DC (Abb. 14) und HPLC Zimtsäure nachweisen (Vergleich mit Referenzsubstanz).

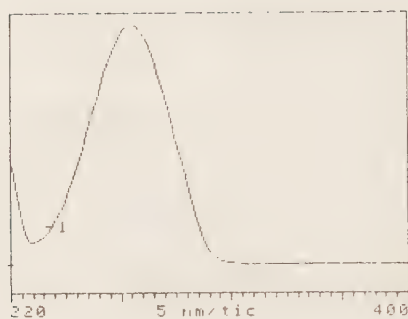


Abb. 11: UV-Spektrum der Zimtsäure

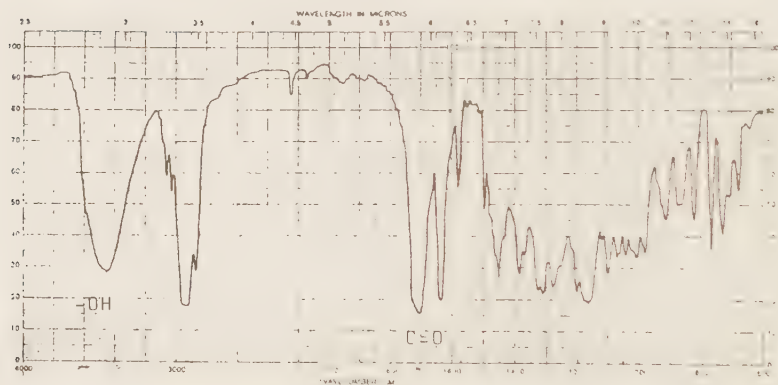


Abb. 12: IR-Spektrum von Ester 1

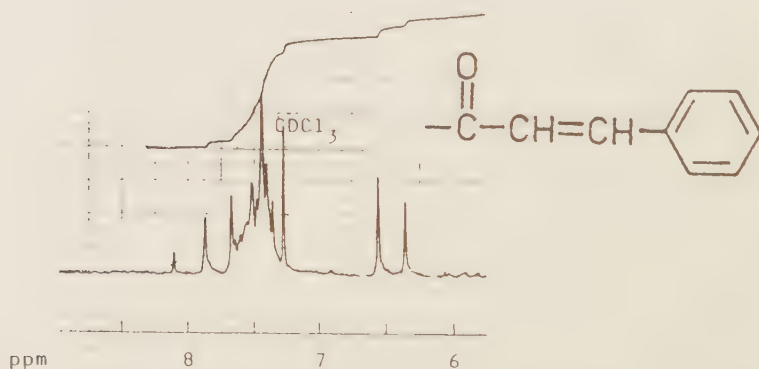
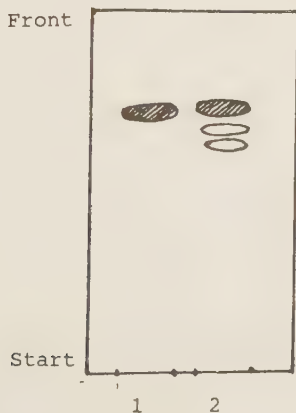


Abb. 13 : ¹H-NMR-Spektrum von Ester 1 (Ausschnitt)

Für den DC-Vergleich verwendeten wir das System Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure (50:40:10) und fanden Übereinstimmung bezüglich des Rf-Wertes (0,7) und des Detektionsverhaltens (Farbe mit dem Detektionsmittel Natriumcarbonat/Kaliumpermanganat). Für den HPLC-Nachweis verwendeten wir ein C18-Umkehrphasen System mit dem Fließmittel Acetonitril-Wasser (1:1, mit 1,5% Essigsäure). Damit war eindeutig nachgewiesen, daß in allen vier Verbindungen Zimtsäure als Säurekomponente vorliegt.



1 = Zimtsäure als Test-Substanz
2 = Hydrolysat von Ester 1

LM : Toluol:Ethylformiat:Ameisensäure (50:40:10)

Detektion : Natriumcarbonat/ KMnO_4

Abb. 14: DC-Nachweis von Zimtsäure im Hydrolysat von Ester 1

IV.2 Strukturaufklärung von Verbindung 1

IV.2.1 Spektroskopische Untersuchungen

Für Verbindung 1, die als gelbes Öl erhalten wurde, ließ sich aus dem Massenspektrum (M^+ 384) die Summenformel $C_{24}H_{32}O_4$ ableiten. Nach der Hydrolyse erhielten wir Zimtsäure, identifiziert durch DC, UV, 1H -NMR und HPLC, sowie eine Verbindung, die einen Molekülpeak bei 254 m/z hatte. Die Summenformel entsprach $C_{15}H_{26}O_3$, sodaß in Verbindung 1 eine Sesquiterpengrundstruktur vorliegen mußte. Verbindung 1 besaß charakteristische IR-Absorptionsbanden bei 3390 cm^{-1} (OH-Gruppe), 3042 cm^{-1} (Streck-Schwingung olefinischer Doppelbindung) und 1663 cm^{-1} (endozyklische Doppelbindung) (107) (Abb.15), sodaß ein Sesquiterpenalkohol vorliegen sollte. Im Massenspektrum von Alkohol 1 war die Abspaltung von 2 Molekülen Wasser zu erkennen, was für mindestens 2 alkoholische Gruppen im Molekül sprach. Das Fragment 43 m/z deutete auf die Anwesenheit einer Isopropylgruppe hin.

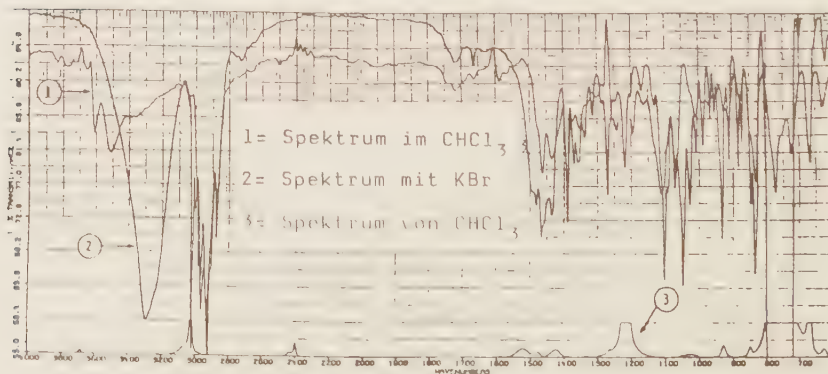


Abb. 15
FT-IR-Spektrum von Alkohol 1

Die Acetylierung von Alkohol 1 mit Acetanhydrid-Pyridin (1:1) ergab ein Diacetat, dessen IR-Spektrum keine Hydroxyl-Bande bei 3390 cm^{-1} mehr zeigte, während das ^1H -NMR Spektrum Signale für 2-Acetyl-Gruppen bei 2.0 ppm und 2.12 ppm aufwies. Somit war das Vorliegen von zwei Hydroxyl-Gruppen wahrscheinlich.

Im ^1H -NMR-Spektrum (80 MHz) von Alkohol 1 waren in Übereinstimmung mit Spektren ähnlicher Sesquiterpenverbindungen (108, 19) zwei quarternäre Methylgruppen (1.80 ppm, 1.25 ppm), ein olefinisches Proton (5.40 ppm) und eine Isopropylgruppe (0.98 ppm, 1.02 ppm) nachweisbar (Abb. 16).

IV.2.2 Röntgenstrukturanalyse von Alkohol 1

Bei Kristallisationsversuchen gelang auch nach mehreren Versuchen aus den folgenden Gemischen keine Kristallisation aus den folgenden Gemischen : DCM/Toluol, Methanol/Hexan, Ether/Hexan, Chloroform/Hexan, Methanol/Chloroform. Aus Chloroform/Toluol erhielten wir bei Raumtemperatur schließlich plättchenförmige Kristalle, die sich für die Röntgenstrukturanalyse eigneten.

Die Zellkonstanten wurden durch Vermessung von 25 ausgewählten Reflexen auf dem Diffraktometer und "Kleinste-Quadrate-Rechnung" bestimmt. Es ergaben sich folgende Zellkonstanten :

$$a = 8.413 \text{ \AA}$$

$$b = 10.962 \text{ \AA}$$

$$c = 16.492 \text{ \AA}$$

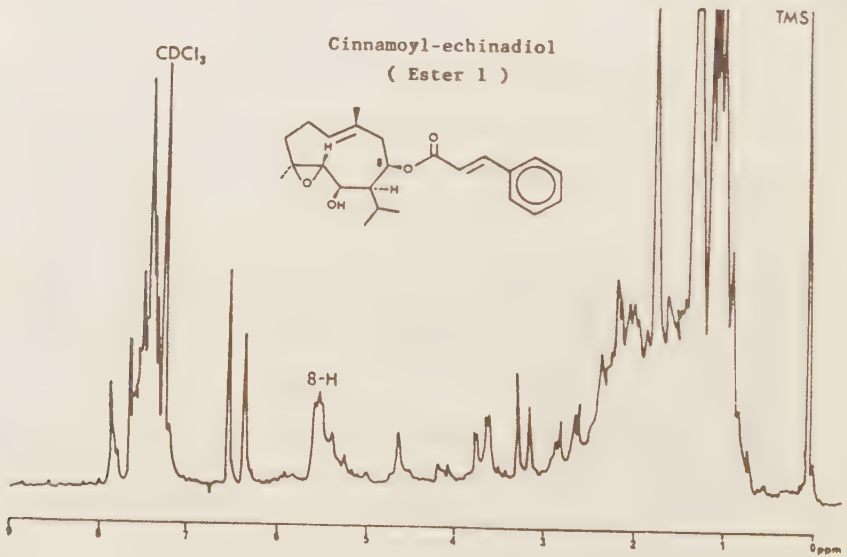
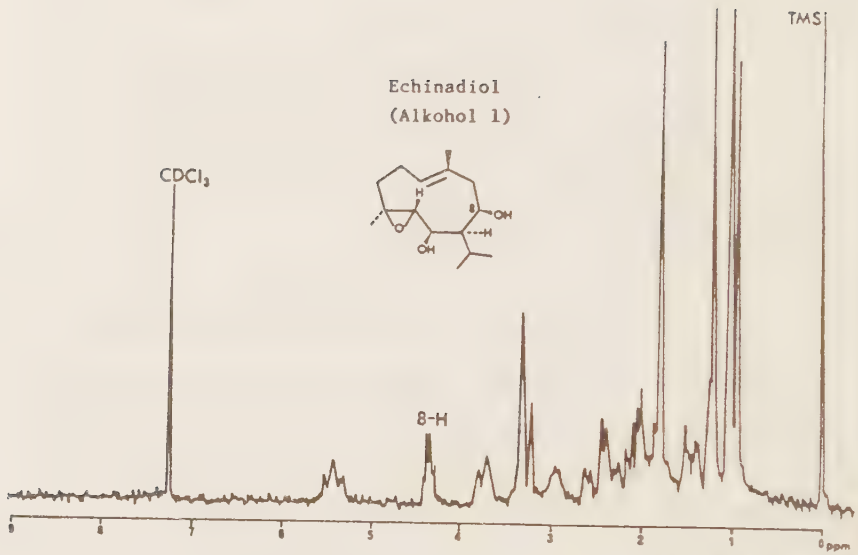


Abb. 16:

¹H-NMR-Spektren von Ester 1 und Alkohol 1

Raumgruppe orthorhombisch $P 2_1 2_1 2_1$, $Z = 4$

$$d_{\text{gem}} = 1.14 \text{ g/cm}^3$$

$$d_{\text{berechnet}} = 1.12 \text{ g/cm}^3$$

1162 unabhängige Reflexe wurden auf einem Nicolet R3m Diffraktometer mit CuK-Strahlung gemessen (davon beobachtet $1081 \geq 3 \sigma(I)$).

Die Dichte wurde mit der Schwebemethode in $\text{H}_2\text{O/KI}$ bestimmt.

Die Reflexintensitäten wurden auf Lorentz-Polarisation in der üblichen Weise korrigiert und die Strukturformfaktoren und E-Werte mit der Wilson-Statistik berechnet. Eine Absorptionskorrektur war in Anbetracht der Kristallgrößen und der reinen Leichtatomstruktur nicht notwendig. Die Struktur wurde gelöst mit "Direkten Methoden" unter Anwendung des SHELXTL-Programmsystems (120). Alle Nichtwasserstoffe zeigten sich in der E-map mit dem besten Phasensatz und anschließenden Differenzfouriersynthesen. Die anisotrope Verfeinerung mit Einheitsgewichten konvergierte bei 9.17% . Die von Computer gezeichnete Struktur ist in Abb. 17 wiedergegeben.

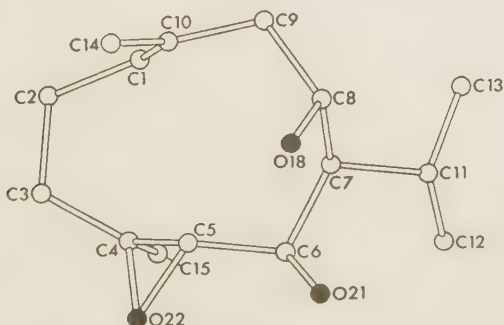


Abb. 17: Relative Konfiguration von Echinadiol (Alkohol 1)

IV.2.3 HOCHFELD-NMR

Nach Kenntnis der Struktur war die Zuordnung aller Signale des NMR-Spektrums möglich. Im ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 16) entspricht das Signal bei 5.4 ppm dem olefinischen Proton H1. Die Signale bei 4.35 ppm und 3.75 ppm stammen von den Protonen H-6 und H-8. Das bei 1.80 ppm liegende Signal der C-14 Methylgruppe ist wegen der Doppelbindung C-1:C-10 zu niedrigem Feld verschoben. Die Signale der Methylgruppen C-12 und C-13 erscheinen bei 0.98-1.02 ppm. Die genaue Zuordnung der anderen Protonen gelang mit Hilfe von Entkopplungsexperimenten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

Tabelle 7: ^1H -NMR-Daten von Alkohol 1 (CDCl_3 : 80 MHz)

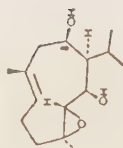
Protonen	δ -Wert (ppm)	Kopplung	J=Hz
1	5.40	d,d	8
8	4.35	d,d	8 , 2
6	3.75	d,d	8 , 2
5	3.27	d	8
9 ab	2.57 , 2.02	d,d	
3	2.42	d,d,d	
2	2.25	m	
11	1.87	m	
14	1.80	s	
7	1.52	m	
15	1.25	s	
12	1.02		
13	0.98	d	6

Die Signale des ^{13}C -NMR-Spektrums konnten wir durch Vergleich mit den Literaturdaten des von HERZ (121) isolierten Eupassopilin zuordnen (Abb. 18). Die Signale der olefinischen Kohlenstoffe C-1 und C-10 liegen bei 125.1 und 135.7 ppm. Die Kohlenstoffe C-6 und C-8 sind erwartungsgemäß bei hohem Feld (76.3 und 68.2 ppm) zu finden, da sie jeweils eine Hydroxylgruppe tragen. Der C-4 Kohlenstoff ergibt ein Signal bei 61.0 ppm, was auf die Epoxidgruppe zurückzuführen ist. Der Kohlenstoff C-5 ist ebenfalls mit einem Sauerstoffatom verknüpft und hat eine OH-Gruppe als Nachbarn. Das entsprechende Signal erscheint bei 73.4 ppm (Tab. 8).

Tabelle 8: ^{13}C -NMR-Daten von Alkohol 1 (CDCl_3 : 25.2 MHz)

	ppm		ppm
C 1	125.1	C 9	45.9
C 2	45.3	C 10	135.7
C 3	36.7	C 11	31.8
C 4	61.0	C 12	21.4
C 5	73.4	C 13	20.8
C 6	76.3	C 14	16.2
C 7	48.2	C 15	29.6
C 8	68.2		

Alkohol 1



* = Signale der Zimtsäure Ester 1

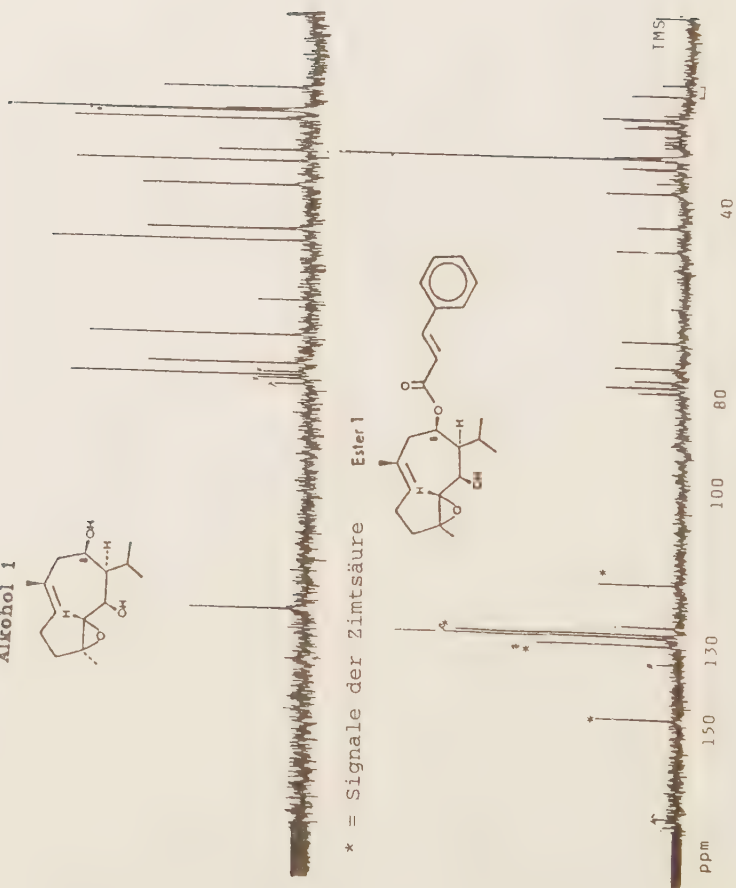
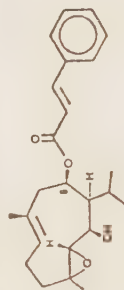


Abb. 18
¹³C-NMR Spektren von Alkohol 1 und Ester 1

Die für Alkohol 1 (Cinnamoyl-echinadiol) gefundene Struktur ist neu und kann als 7,8-Epoxy-9-hydroxy-10-isopropyl-3,7-dimethyl-3-cyclododecen-1-yl cinnamat bezeichnet werden (128). Da wir Alkohol 1 ursprünglich aus *Echinacea purpurea* isoliert zu haben glaubten, gaben wir ihm den Namen Echinadiol (128).

Aus der Lauracee *Parabenzoin trilobum* NAKAI (116) und aus der Apiacee *Thapsia villosa* L. (122) wurde Shiromodiol, eine zu Echinadiol isomere Verbindung schon früher isoliert. Ein dünnschichtchromatographischer Vergleich im Laufmittelsystem Toluol-Ethylacetat (7:8) ergab, daß beide Substanzen deutlich unterschiedliche R_f-Werte zeigten (vgl. Abb. 19).

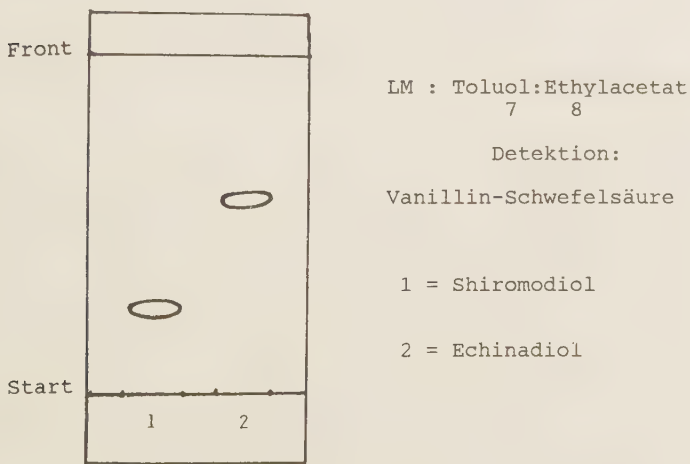


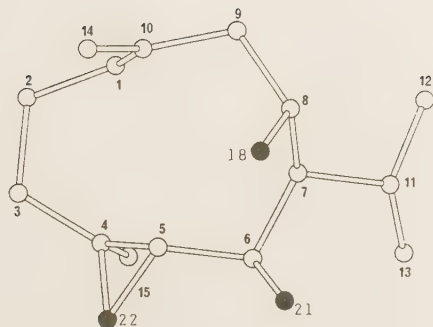
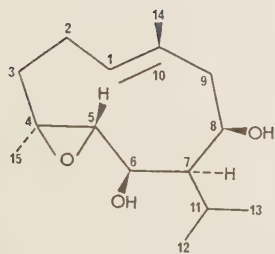
Abb. 19:

DC-Vergleich von Alkohol 1 und Shiromodiol

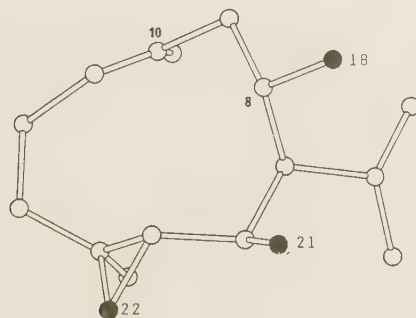
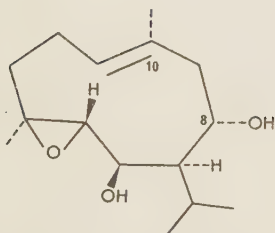
Da von WADA und Mitarb. (129) und McCLURE (130) die Absolutkonfiguration von Shiromodiol bestimmt worden war, konnten wir die Röntgendaten direkt vergleichen (Abb. 20). Es ergaben sich von Shiromodiol abweichende Torsionswinkel in Bezug auf die Orientierung der Hydroxylgruppe am C-8 und an der Doppelbindung. Nimmt man eine α -Position des Protons am C-7 an, so besitzen beide OH-Gruppen β -Orientierung. Bei Shiromodiol dagegen liegt bei der Hydroxylgruppe am C8 eine α -Orientierung vor. Die Unterschiede in den Torsionswinkeln sind in Tab. 9 zusammengefasst. Alkohol 1 und Shiromodiol stellen somit Diastereomere dar. Außerdem scheint ein Unterschied in der Raumstruktur der Doppelbindung vorzuliegen. Während bei Echinadiol eine anti-Anordnung der Methyl-Gruppen C-14 und C-15 zu erkennen ist, kann man bei Shiromodiol von einer syn-Anordnung sprechen.

Von verschiedenen russischen Arbeitsgruppen (123-27) wurde über das Vorkommen einer mit Shiromodiol identischen Verbindung (Ugamdiol) in verschiedenen Ferula-Arten berichtet. Allerdings wird hier nicht auf die absolute Konfiguration eingegangen, sodaß ein Vergleich mit dieser Verbindung nicht möglich ist.

Echinadiol wird im CA-Registry File mit folgender Bezeichnung geführt: 11-Oxabicyclo-[8,1,0]-undec-6-ene-2,4-diol-6,10-dimethyl-3-(1-methylethyl)-[1S-(1R*,2S*,3S*,4S*,6E,10R*)], was der vermuteten Absolutkonfiguration entspricht.



Echinadiol (isoliert aus *Parthenium integrifolium*)



Shiromodiol (Absolute Konfiguration)
Mc Clure et al. (1970)

Abb. 20:

Vergleich der relativen Konfiguration von Echinadiol
(Alkohol 1) und Shiromodiol

Tabelle 9: Vergleich der Torsionswinkel von Echinadiol
(Alkohol 1) und Shiromodiol

	Echinadiol	Shiromodiol
C(8)-C(9)-C(10)-C(1)	-90.4	64.0
C(10)-C(1)-C(2)-(3)	-73.0	111.9
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	91.2	154.3
C(6)-C(7)-C(8)-O(18)	13.9	108.7
C(11)-C(7)-C(8)-O(18)	-112.8	-21.5
O(18)-C(8)-C(9)-C(10)	-58.9	174.7

IV.3 Strukturaufklärung von Alkohol 2a

Alkohol 2a, welcher sich mit Godin-Reagens gelb anfärbte, erwies sich auf Grund des Molekulargewichtes von 254 und der Summenformel $C_{15}H_{26}O_3$ als isomer zu Alkohol 1.

Die IR-Spektren von Ester 1 und Ester 2a waren ähnlich. Nach Hydrolyse erschien im IR-Spektrum von Alkohol 2a ein Signal bei 1710 cm^{-1} , das auf die Anwesenheit einer Carbonylgruppe hinwies. Eine Bande im Bereich $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ sprach für das Vorliegen von Hydroxylgruppen (Abb. 21).

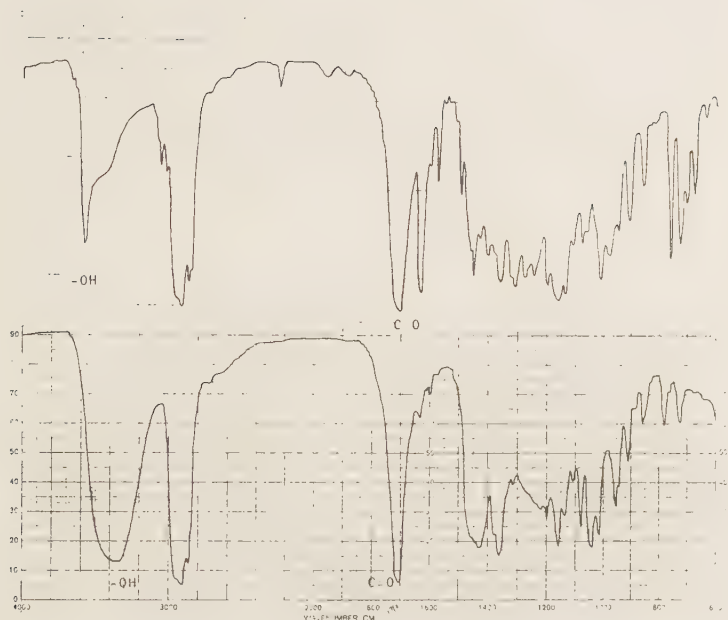


Abb. 21:

IR-Spektren von Ester 2a (oben) und Alkohol 2a (unten)

Im Massenspektrum von Alkohol 2a war die Abspaltung zweier Moleküle Wasser zu erkennen (254---236---218). Die Abspaltung von 43 m/z ($\text{CH}_3\text{-CO}$) sowohl von Fragment 236 m/z als auch von 218 m/z ergab Fragmente bei 193 m/z bzw. 218 m/z (Abb. 22).

Aus einem ^1H -NMR-Spektrum-Vergleich mit Alkohol 1 (Abb. 23) war ersichtlich, daß eine Methylgruppe zu niedrigerem Feld (2.15) ppm verschoben war. Im Bereich der olefinischen Protonen traten keine Signale auf. Die Signale einer Isopropylgruppe waren identisch mit denen

von Alkohol 1. Ebenso sollte die Stellung der OH-Gruppen gleich sein. Die Anwesenheit von Signalen im Bereich sehr hohen Feldes (0.4-0.25 ppm) deutete darauf hin, daß in Alkohol 2a ein Cyclopropanring vorhanden sein könnte.

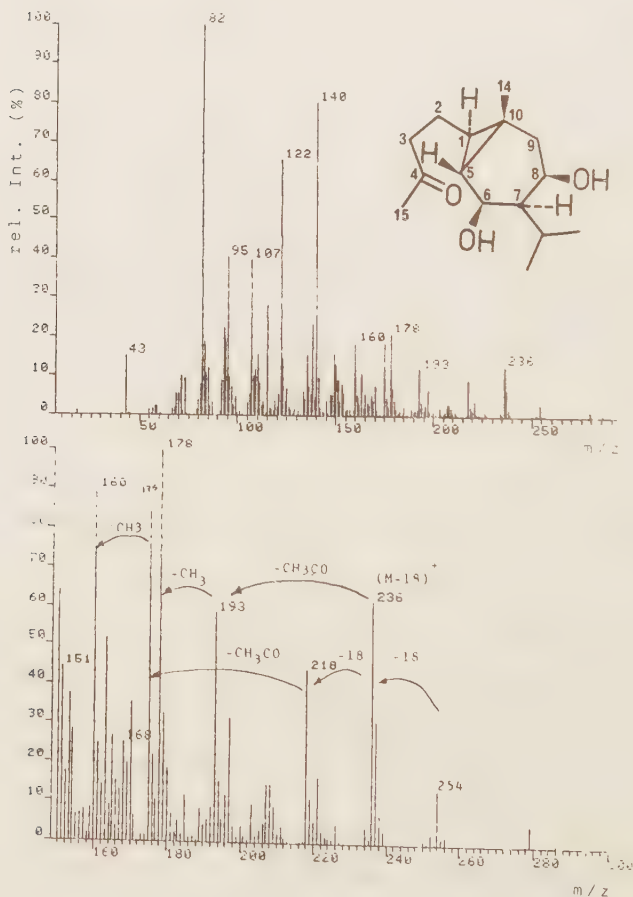


Abb. 22:

Massen-Spektrum von Echinaxanthol (Alkohol 2a)

Die Acetylierung von Alkohol 2a mit Acetanhydrid-Pyridin (1:1) ergab ein Diacetat, das im ^1H -NMR-Spektrum zwei Acetyl-Signale bei 2.01 ppm und 2.12 ppm lieferte. Dieses Ergebnis sprach erneut für die Anwesenheit von zwei Hydroxylgruppen.

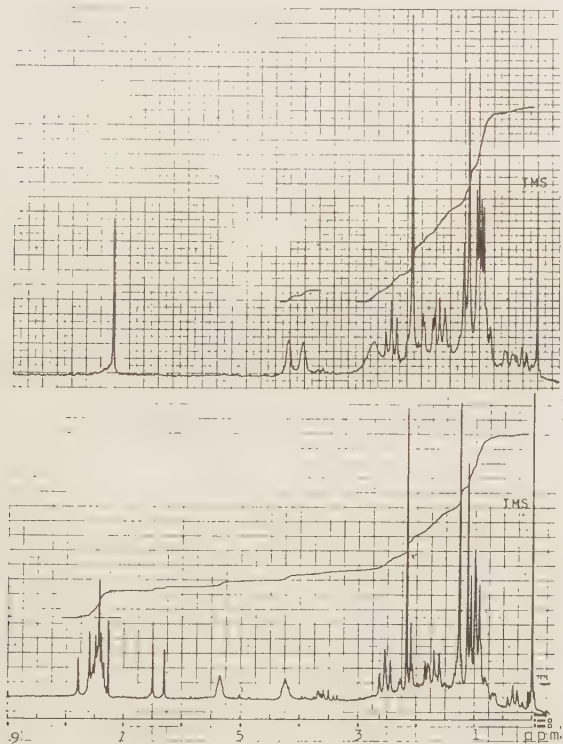


Abb. 23:

^1H -NMR-Spektren von Alkohol 2a (oben)
und Ester 2a (unten) (80 MHz)

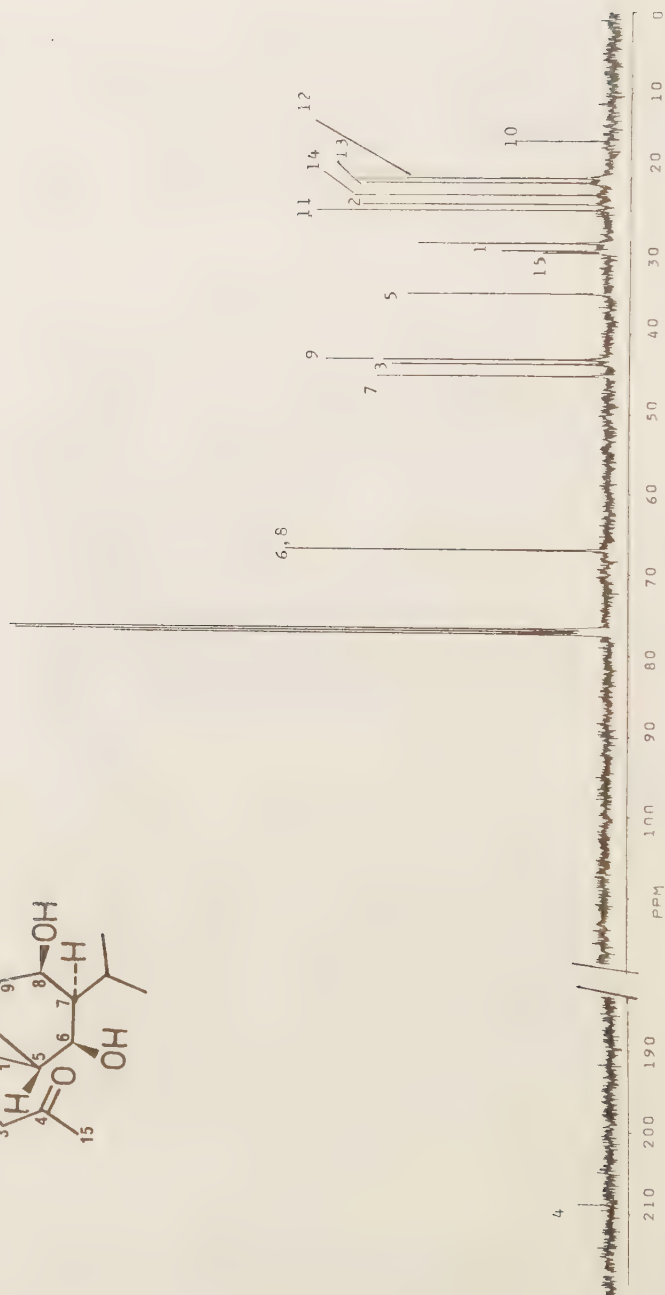
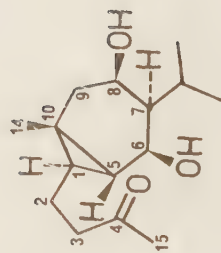


Abb. 24: ¹³C-NMR Spektrum von Echinaxanthol (Alkohol 2a)

Im ^{13}C -NMR-Spektrum zeigten sich vier Quartetts, drei Triplets, sechs Dubletts und zwei Singulets, wobei beide Singulets andere Verschiebungen aufwiesen als jene im ^{13}C -Spektrum von Alkohol 1 (Abb. 24). Ein Singulett bei 208.75 ppm, sprach erneut für das Vorliegen einer Keto-Gruppe. Ein zweites Singulett erschien bei 16.02 ppm und stammte von einem quaternären Kohlenstoff. Im Bereich von 60-80 ppm trat nur ein Signal auf. Es mußte zu den beiden Hydroxylgruppen tragenden Kohlenstoffen gehören.

Die endgültige Ableitung der Struktur gelang mit NOE-Experimenten und COSY-Spektren.

IV.3.1 COSY-SPEKTREN

"Normale", eindimensionale Spektren werden in der Regel mit Puls-Fourier-Transformations-Technik aufgenommen bzw. ausgewertet. Dabei werden durch eine Sequenz von Hochfrequenzimpulsen, dem sog. "Puls", alle Kernmagnete gleichzeitig angeregt. Die Kernmagnete, die sich vorher, gemäß der Boltzmann-Verteilung, in einer resultierenden longitudinalen Magnetisierung (in Richtung des äußeren Magnetfeldes H_0) befanden, erfahren durch diesen Puls eine Quermagnetisierung um den Pulswinkel (transversale Magnetisierung). Der Abfall dieser Quermagnetisierung wird FID (free induction decay) genannt, stellt ein Interferogramm aus zahlreichen überlagerten gedämpften Schwingungen dar und kann durch einen geeigneten Empfänger registriert werden. Das Empfängersignal ist dabei eine Funktion der Detektionszeit t_2 . Durch die Fourier-Transformation kann das Signal dann aus der Zeitdomäne in die Frequenzdomäne und damit in das Bild eines normalen Spektrums transformiert werden. Die Grundlage eines 2D-Spektrums ist nun die Anwendung von sog. Puls-Sequenzen. Wird nämlich die zwischen den Impulsen der Puls-Sequenz liegende Evolutionszeit t_1 systematisch variiert, dann ist das Empfängersignal eine Funktion von t_1 und t_2 . Somit beinhaltet die Fourier-Transformation dann auch 2 Frequenzvariable F_1 und F_2 . Nach entsprechender mathematischer Manipulation erhält man danach ein Konturdiagramm (mit den Achsen F_1 und F_2). Je nach eingestrahlter Puls-Sequenz lassen sich J (Kopplungs-) aufgelöste 2D-Spektren oder Shift-korrelierte 2D-Spektren, erhalten bei denen auf beiden Achsen F_1 und F_2 chemische Verschiebungen aufgetragen sind. Die für ein Shift-korreliertes homonukleares 2D-Spektrum übliche Pulsfolge war 90° -Impuls/ t_1 / 90° -Impuls/FID (t_2). Hier bewirkt der erste 90° -Impuls eine transversale

Magnetisierung, die sich während t1 entsprechend der chemischen Verschiebung und der Kopplungen entwickelt (Evaluationszeit). Der zweite 90°-Impuls bewirkt einen Magnetisierung-Transfer unter den verschiedenen Übergängen von gekoppelten Spin-Systemen. Betrifft dieser Transfer Übergänge im selben Kern, so liegen die entsprechenden Peaks in der 2D-Matrix auf der Diagonale F1=F2. Tritt er zwischen verschiedenen gekoppelten Spin auf, so resultieren Peaks außerhalb der Diagonale, mit den Koordinaten (δA, δB) und (δB, δA). Die für eine Kopplung zwischen zwei Kernen auftretenden Peaks bilden so die 4 Ecken eines Quadrates.

Zu nähren Einzelheiten bezüglich der zum Teil sehr komplizierten physikalischen Vorgänge und Anwendung verschiedener anderer Puls-Sequenzen sei auf eine bibliographische Auswahl verwiesen (131).

Mit Hilfe dieser 2D-NMR (COSY)-Technik gelang es die Hochfeld-Protonen und Methylgruppen zuzuordnen. Die einzelnen Kopplungen sind im Spektrum mit Linien eingezeichnet (siehe Abb. 25). Das Signal, das bei 1.17 ppm als Singulett erscheint mußte eine Methylgruppe sein, die an einem quarternären Kohlenstoff sitzt. Die zweite Methylgruppe tritt als Singulett bei 2.15 ppm auf, was darauf hindeutet, daß sie benachbart zu einer Carbonylgruppe steht. Proton p koppelt mit dem vicinalen Proton n, das wiederum mit Proton a und p koppelt. Auf diese Weise ließ sich das gesamte Molekül-Fragment von C-3 nach C-9 über C-1 und C-5 strukturell festlegen (vgl. Abb. 26).

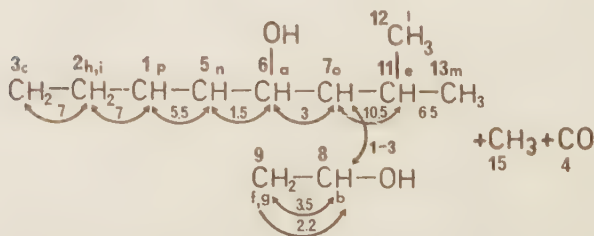
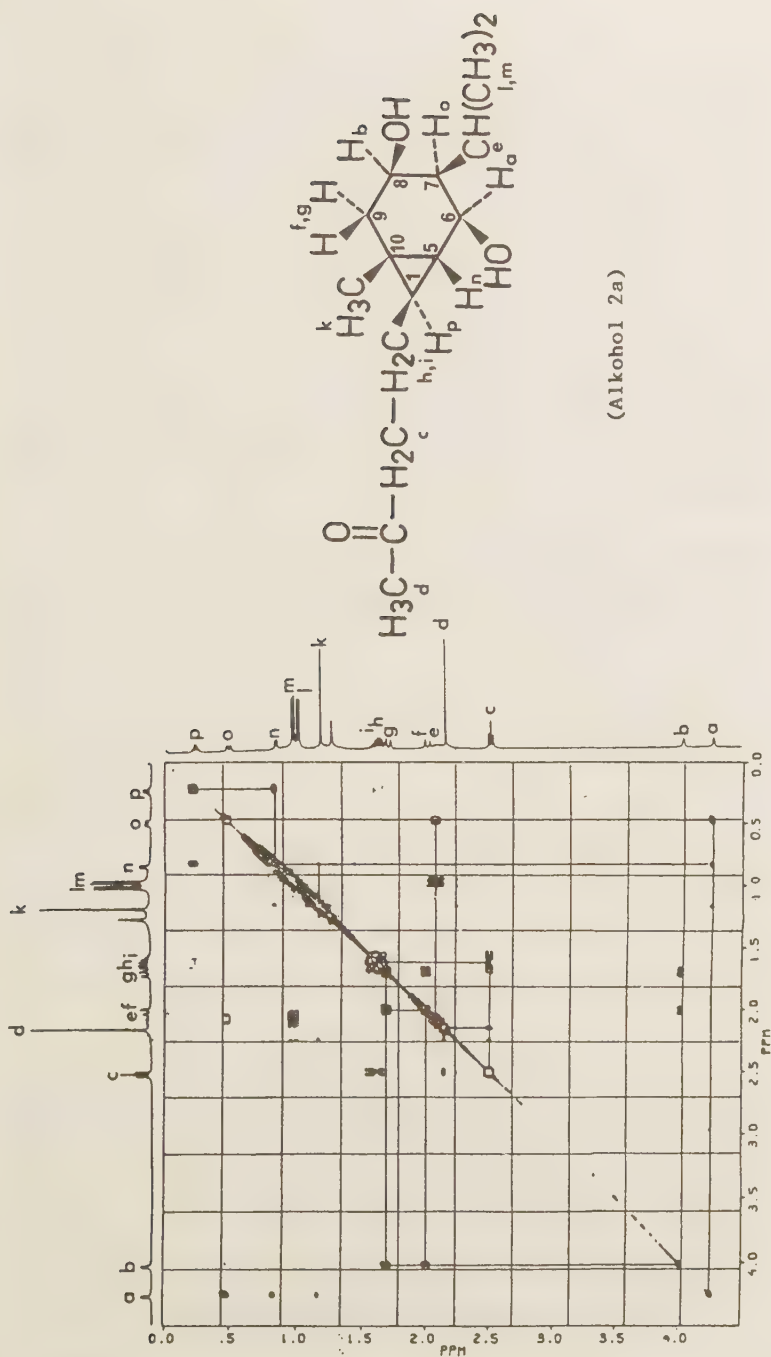


Abb. 26: Kopplungskonstanten der Protonen des Fragments von Echinaxanthol (Alkohol 2a)



(Alkohol 2a)

Abb. 25: COSY-Spektrum von (Echinaxanthol) Alkohol 2a

NOE Experiment

Durch NOE* Experimente (vgl. Tab. 10) zeigte sich, daß die Hydroxylgruppen und Isopropylgruppen am C6, C8 und C7 syn-Orientierung aufwiesen. Proton n mußte sich mit k ebenfalls in einem syn-System befinden. Folglich ergibt sich für Alkohol 2a die in Abb. 27 gezeigte relative Konfiguration. Alkohol 2a ist somit ein 5-Hydroxy-4-isopropyl-1-methyl-7-(oxobutyl)-bicyclo-[4.1.0]-hept-3-yl-cinnamat, das von uns mit Cinnamoyl-echinaxanthol bezeichnet wurde (128).

Tabelle 10: NOE-Daten von Alkohol 2a (Echinaxanthol)

Einstrahlung	Beobachteter NOE
a	n , o , l
b	f , g , m , o
k	c , f , h , i , n
n	a , h , i
o	a , b , e , p
p	a , c , g , h , i , o

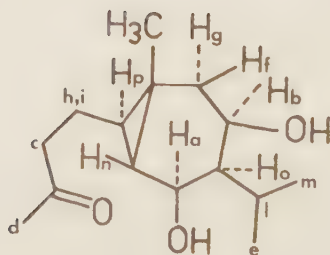


Abb. 27
Relative Konfiguration von Echinaxanthol

Alkohol 2a unterscheidet sich in seiner Konformation von Isorhombiodol, das von Bohlmann und Mitarb. (132) in Kleinia-Arten gefunden wurde, und die Methylgruppen C-14 und C-15 in "anti"-Stellung aufweist. Alkohol 2a weist andererseits Ähnlichkeit mit dem von Hitoshi und Mitarb. (133) erstmals aus *Carpesium abrotanoides* isolierten CARABRON auf. Eine ähnliche Verbindung wie Alkohol 2a wurde auch von WADA und Mitarb. (134) als thermisches Umwandlungsprodukt von Shiromodiol gefunden, wobei es sich in unserem Fall jedoch eindeutig um eine genuine Verbindung handelt.

Alkohol 2a ist damit ein neues Secoguajan-derivat mit cyclopropanoidem Xanthangerüst, dem wir den Namen Echinaxanthol gaben (128).

Von Fischer (135-36) wurde für die Biosynthese von Xanthanolid-Verbindungen das in Abb. 28 wiedergegebene Schema vorgeschlagen. Bei Germacranoliden, die die C-14 und C-15 Methylgruppe in syn-Orientierung tragen, kommt es nach Protonierung des Epoxid-Sauerstoffs zu einem nucleophilen Markovnikov-Ringschluß C-1 - C-5 mit cis-Verknüpfung, und schließlich zu einer Hydridwanderung

* Durch Einstrahlung in den Frequenzbereich eines Kerns erfolgt ein Eingriff in die Relaxation räumlich benachbarter Kerne. Das führt naturgemäß zu einer Intensitätsänderung bei den Signalen der Nachbarkerne (Kern-Overhauser-Effekt). In der H-Resonanz spielt dieser Effekt lediglich eine Rolle bei Doppelresonanz-Experimenten. In der ¹³C-Resonanz mißt man dagegen Routine-Spektren mit einer H-Breitband-Entkopplung. Dadurch fallen die durch Kopplung mit den Protonen bewirkten Signalaufspaltungen weg und man erhält ein Spektrum aus einzelnen Singulett Peaks.

von H-1 α zu C-10 α und Bindungsbruch zwischen C-4 und C-5, was zum Xanthanolidgerüst führt (135). Die Biosynthese von C-14/C-15 anti-orientierten Germacranoliden erfolgt entsprechend, nur daß es zu einer trans-Verknüpfung kommt, und die Stabilisierung durch einen Ringschluß zum Cyclopropan erfolgt (137). Letzterem Biosyntheseweg entspricht vermutlich auch die Entstehung von Echinaxanthol aus Echinadiol, das nach der Röntgenstrukturanalyse ebenfalls Anti-Anordnung der Methylgruppen besitzt.

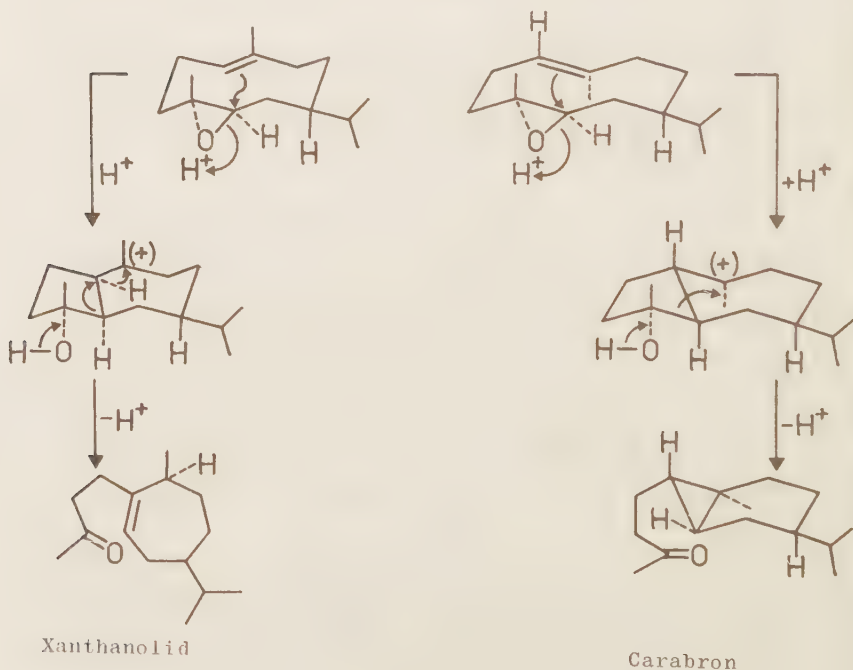


Abb. 28: Biosynthese-Schema für Xanthanolide nach (142)

IV.4 Strukturaufklärung von Alkohol 2b

IV.4.1 Spektroskopische Voruntersuchungen

Alkohol 2b wurde nach Hydrolyse von Ester 2b in öliger Form erhalten. Da das UV-Spektrum nur eine Endabsorption aufwies, sollter keinen Chromophor besitzen. Das IR-Spektrum deutete nur auf die Anwesenheit von Hydroxylgruppen hin (Abb. 29). Aus einem bei 80 MHz aufgenommenen ^1H -NMR-Spektrum konnten bereits einige wichtige Strukturfragmente abgeleitet werden (Abb. 30). Signale im Bereich 0.98-1.02 ppm deuteten wieder auf das Vorliegen einer Isopropylgruppe hin. Sie lagen in etwa der gleichen Position wie bei Alkohol 1 und 2a. Im olefinischen Bereich war kein Signal zu erkennen. Das deutete darauf hin, daß vermutlich keine Doppelbindung vorhanden war. Zwei Methylgruppen erschienen bei 1.3 und 1.4 ppm.

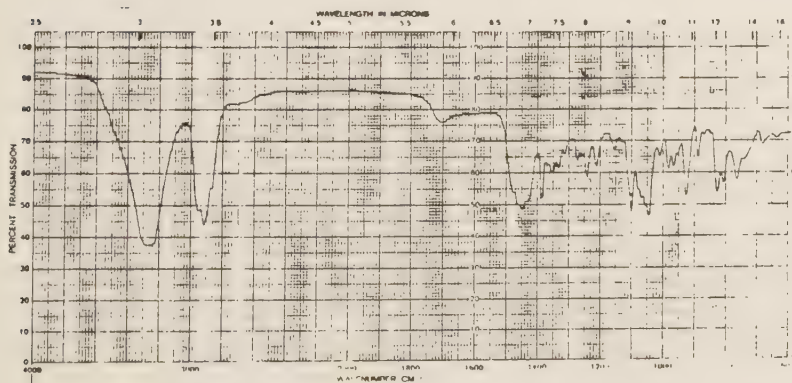


Abb. 29: IR-Spektrum von Epoxyechinadiol (Alkohol 2b)

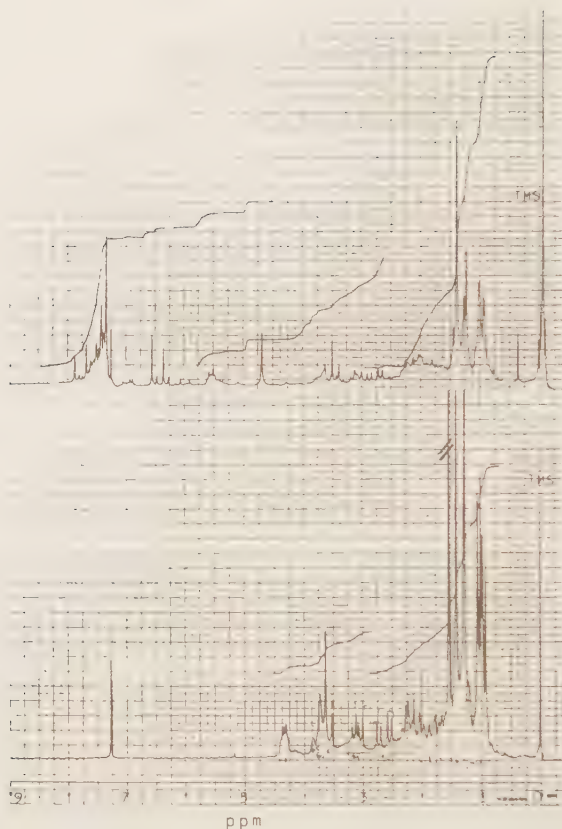


Abb. 30: ^1H -NMR (80 MHz) Spektren von Alkohol 2b (unten) und Ester 2b (oben)

Aus dem Massenspektrum konnten wir ein Molekulargewicht von 270 ableiten. Damit sollte Alkohol 2b ein Sauerstoffatom mehr besitzen als Alkohol 1 und Alkohol 2a. Die Fragmentierung ließ jedoch nur die Eliminierung von zwei Wassermolekülen erkennen, sodaß nur zwei freie Hydroxylgruppen zu erwarten waren.

Nach Acetylierung von Alkohol 2b zeigte das ^1H -NMR-Spektrum (80 MHz) zwei Signale im Acetyl-Bereich, womit die Anwesenheit von zwei OH-Gruppen bewiesen schien.

IV.4.2 Röntgenstrukturanalyse von Alkohol 2b

Alkohol 2b kristallisierte aus einem Gemisch Toluol/ Chloroform in farblos dursichtigen Quadern von etwa 0.4 mm Größe. Die Kristalldaten wurden durch Vermessung von 25 ausgewählten Reflexen auf dem Diffraktometer und "Kleinste-Quadrate-Rechnung" bestimmt:

$$a = 8.269 \text{ \AA}$$

$$b = 10.968 \text{ \AA}$$

$$c = 16.700 \text{ \AA}$$

Raumgruppe orthorhombisch $P 2_1 2_1 2_1$, $Z = 4$

$$d_{\text{gemessen}} = 1.10 \text{ g/cm}^3, d_{\text{berechnet}} = 1.11 \text{ g/cm}^3$$

1162 unabhängige Reflexe wurden auf einem Nicolet R3m Diffraktometer mit CuK-Strahlung gemessen (davon beobachtet $1091 \geq 3 \sigma(I)$). Die Dichte wurde mit der Schwemethode in H_2O/KI bestimmt.

Die Reflexintensitäten wurden auf Lorentz-Polarisation in der üblichen Weise korrigiert und die Strukturfaktoren und E-Werte mit Wilson-Statistik berechnet. Eine Absorptionskorrektur war in Anbetracht der Kristallgröße und Leichtatomstruktur nicht notwendig. Die Struktur wurde mit "Direkten Methoden" unter Anwendung des SHELXTL-Programmsystems gelöst (120). Alle Nicht-Wasserstoffe zeigten sich in der E-map mit dem besten Phasensatz und anschließenden Differenzfouriersynthesen. Die anisotrope Verfeinerung mit Einheitsgewichten konvergierte bei 9.35%. Die Kristallstruktur zeigt Abb 31. Nach Kenntnis der Struktur von Alkohol 2b versuchten wir die Signale der NMR-Spektren zuzuordnen. Als Vergleichs-

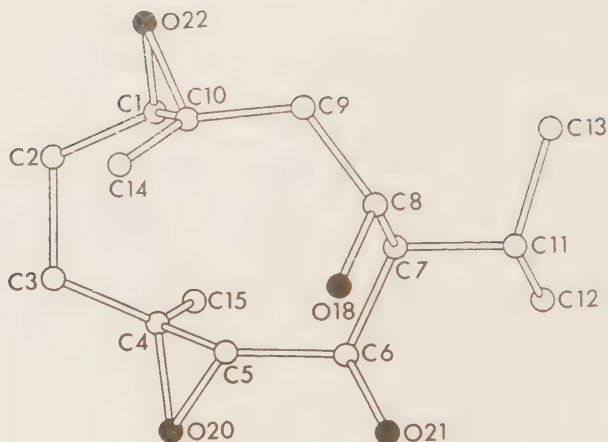


Abb. 31: Relative Konfiguration von Epoxyechinadiol
(Alkohol 2b)

substanzen mit bekannten NMR-Daten boten sich dazu verschiedene Germacrane mit ähnlicher Struktur an, die von Bohlmann (138) aus *Senecio petraeus* (3 β -6 β -Dioxy-4,5,6,7H-4,5-epoxygermacren) und von Terasa (122) aus *Thapsia villosa* (1(10),4(5) Diepoxygermacren-6,8 diol) isoliert wurden. Außerdem wurde mit Alkohol 1 verglichen.

Die Signale im niedrigen Feld bei 4.37 ppm und 3.75 ppm waren den Protonen H-8 und H-6 zuzuordnen. Die beiden Methyl-gruppen am C-4 und C-10 erschienen bei 1.30 bzw. 1.40 ppm.

Alkohol 2b besitzt damit die gleiche Konformation wie Alkohol 1. Die neue Verbindung nannten wir Epoxyechinadiol. Die Struktur von Ester 2b wäre demnach 4,5:8,9-Diepoxy-2-isopropyl-5,9-dimethyl-cyclodecyl-cinnamat (128).

IV.5 Strukturaufklärung von Alkohol 3

Alkohol 3 erhielten wir ebenfalls in öligler Form. Das IR-Spektrum zeigte keine Carbonyl-Bande. Im Bereich von $3300\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ erschien dagegen eine deutlich ausgeprägte OH-Bande (Abb. 32).

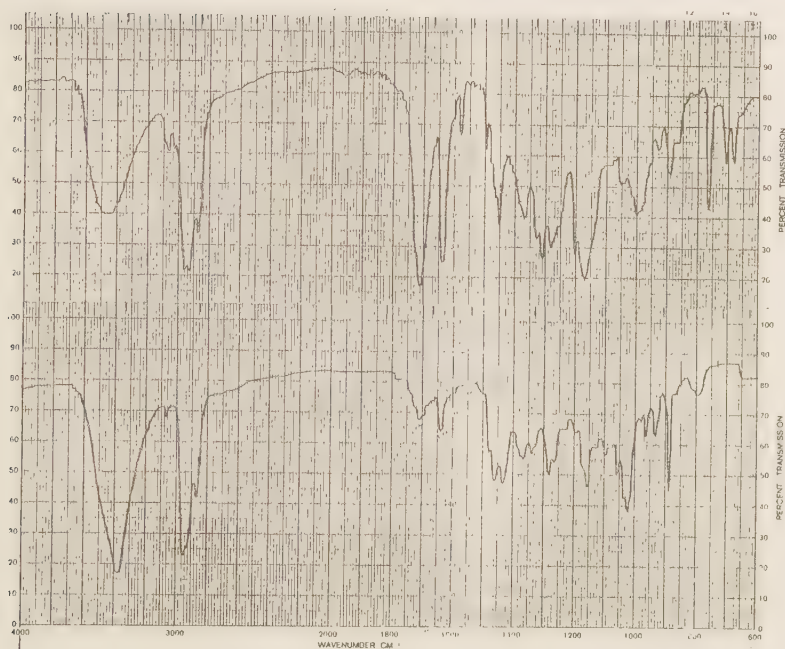


Abb. 32: IR-Spektrum von Ester 3 (oben) und Alkohol 3 (unten)

Das Massenspektrum (Abb.33) ergab einen Molekülpeak bei 254 m/z, dem die Summenformel $C_{15}H_{26}O_3$ entsprach. Die Fragmentierung (254---236---218) wies auf die Abspaltung von zwei OH-Gruppen hin.

Aus dem bei 80 MHz aufgenommenen 1H -NMR-Spektrum konnten wir folgende Hinweise entnehmen (Abb. 34): Wie bei den anderen Verbindungen sollte eine Isopropylgruppe vorhanden sein. Ein Singulett bei 4.75 ppm sprach für eine endständige ungesättigte CH_2 -Gruppe.

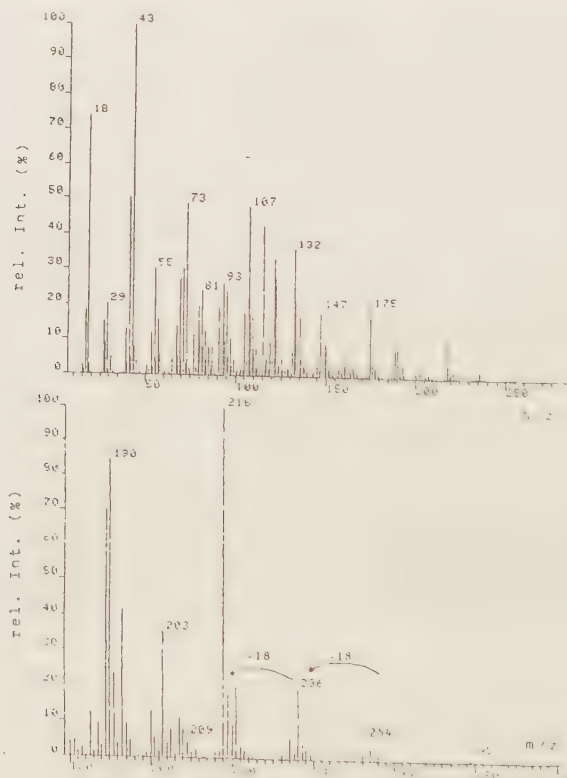


Abb. 33: Massen-Spektrum von Alkohol 3

Nach Acetylierung von Alkohol 3 zeigte das ^1H -NMR-Spektrum (80 MHz) drei Signale im Acetat-Bereich, was vermuten ließ, daß Alkohol 3 drei OH-Gruppen enthält. Für die endgültige Strukturaufklärung von Alkohol 3 verwendeten wir das Hochfeld-NMR. In einem bei 400 MHz aufgenommenen ^1H -NMR-Spektrum zeigte sich das im 80 MHz-NMR-Spektrum als Singulett erscheinende Signal als Dublett bei 4.75 ppm. Es mußte daher von einer $=\text{CH}_2$ Gruppe stammen. Auch die Multiplizität der übrigen Signale war aus dem 400 MHz NMR-Spektrum ersichtlich (vgl. Abb. 35).

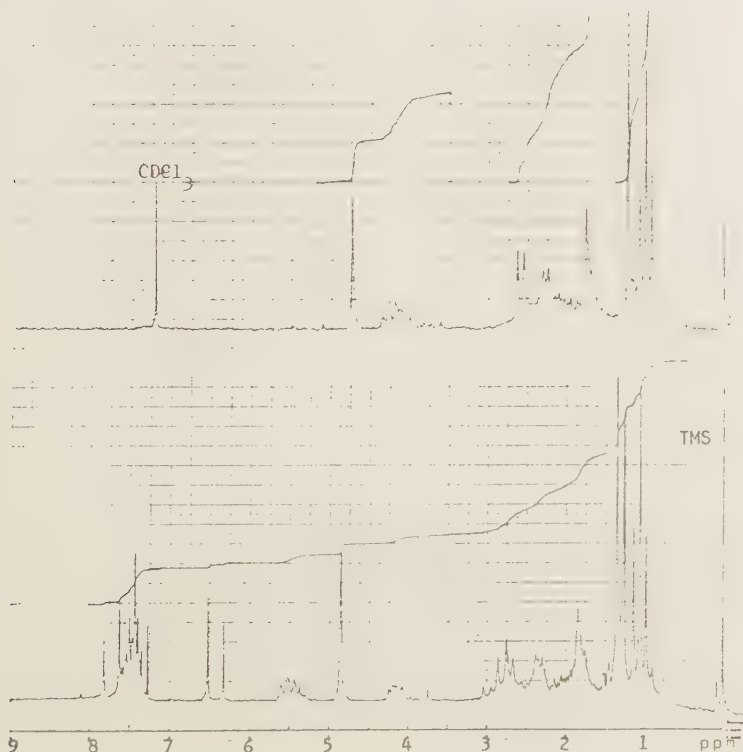


Abb. 34: ^1H -NMR (80 MHz) Spektren von Ester 3 (unten) und Alkohol 3 (oben)

Die Signale der Isopropylgruppe erschienen bei 0.98 ppm und 1.02 ppm. Die Signale bei 4.28 ppm und 4.12 ppm konnten wir den CH-OH Protonen in Stellung C-8 und C-6 zuordnen. Ein Signal bei 1.25 ppm deutete auf eine quaternäre Methylgruppe hin. Um die übrigen Signale zuzuordnen führten wir COSY- und NOE-Experimente durch.

IV.5.1 COSY SPEKTRUM

Mit einem H-H Korrelationsspektrum (COSY-Spektrum) konnten wir die in Abb. 36 gezeigten Fragmente erkennen. Im Spektrum sind die wichtigsten Kopplungen mit Strichen gekennzeichnet. Sie zeigen, daß die Protonen 14a und 14b mit den Protonen 9a und b koppeln ($J=0.7-1.0$). Proton 8 erscheint bei 4.287 ppm und koppelt mit Proton 7 (1.096 ppm, $J=1.4$) und den Protonen 9a,b (2.64-2.59 ppm). Proton 8 koppelt außerdem mit Proton 6. Proton 11 koppelt mit den vicinalen Methylgruppen 12, 13 und Proton 7 ($J=6.6$).

NOE-Experimente

Um benachbarte Protonen zu erkennen, wurden verschiedene NOE Experimente unternommen. In Tab. 11 sind die beobachteten NOE Effekte aufgelistet. Da nicht alle Protonen deutlich zu erkennen waren, wurden die Experimente noch einmal in C_6D_6 aufgenommen. Hier konnte man insbesondere die ^3J -Kopplung* zwischen den Protonen c und d erkennen (vgl. Abb. 37). Zum zweiten zeigten diese Experimente, daß folgende Fernkopplungen vorliegen: n-h, h-o, g-e und g-j,k.

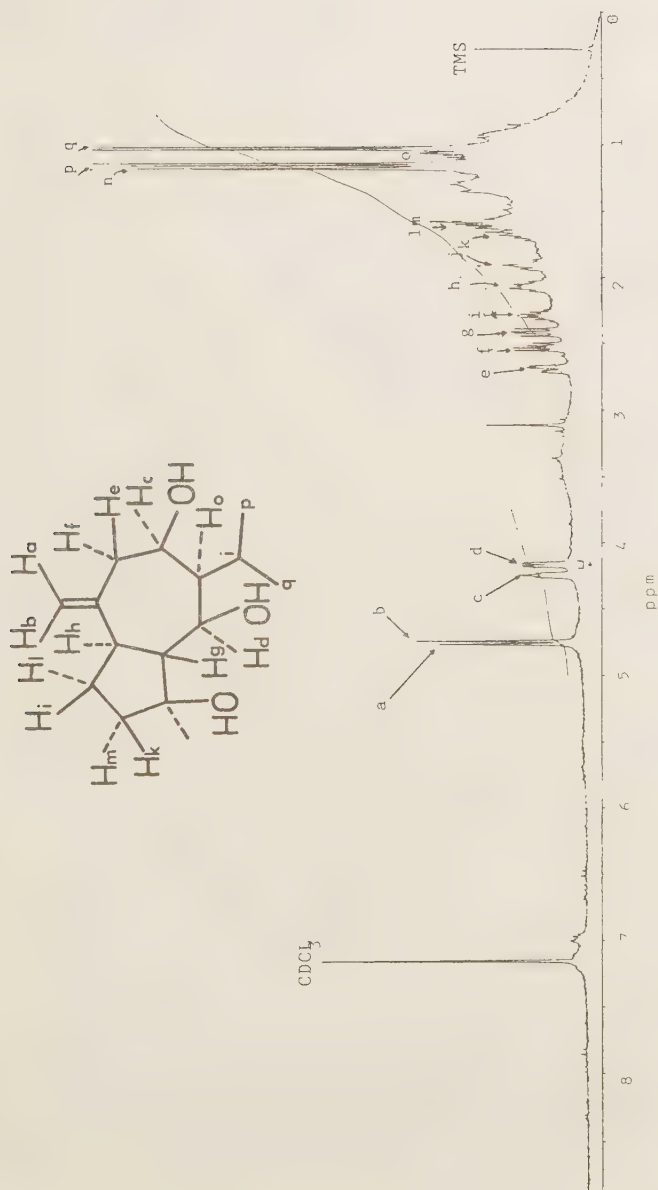
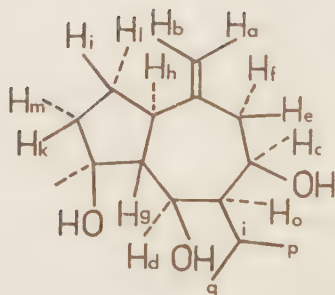


Abb. 35
 ^1H -NMR Spektrum von Alcohol 3 (400 MHz)

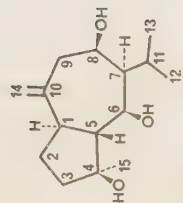
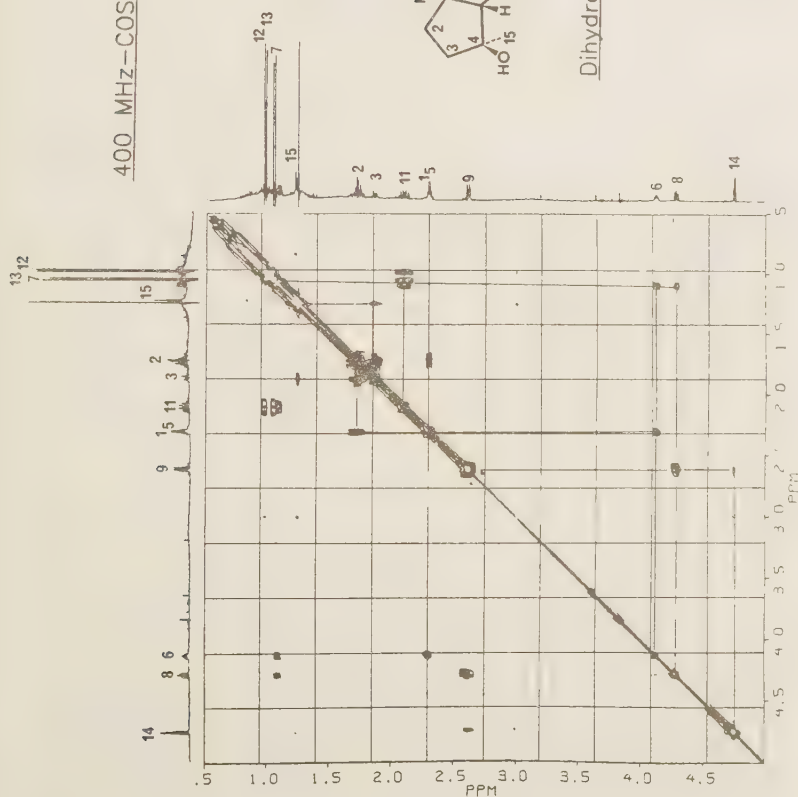
Tabelle 11: NOE-Daten von Dihydroxynardol (Alkohol 3)

Einstrahlung	Beobachteter NOE
In CDCl_3	
ab	ef, gh, klm
ef	ab, c, gh
gh	d, ef, jklm, n, o
n	d, gh, klm
In C_6D_6	
n	d, h, l
j	klm, g
h	b, g, klm, o
g	d, e, h, j, h
f	c, e
e	ab, c, f, g
d	g, o



* Fern- oder longrange-Kopplungen gehen über zwei oder mehr Bindungen. Bei offenkettigen, gesättigten Verbindungen sind sie meist kleiner als 1 Hz und spielen keine Rolle. Bei kondensierten Alicyclen ändert sich das, wenn eine starre W-Anordnung der Bindungen der J-Kopplung vorliegt (151).

400 MHz-COSY-NMR-Spektrum



Dihydroxyngardol

Abb. 36
400 MHz-COSY-NMR-Spektrum von Alkohol 3

Um die Alkohol 3 zugrundeliegende Konfiguration zu ermitteln wurde eine Spektren-Simulation* mit zwei unterschiedlichen Modell-Spinsystem (A und B) durchgeführt (Abb. 38). Im Fragment A war für die Protonen 4 und 5 nur ein einfaches Kopplungssystem zu beobachten. H-4 und H-5 zeigten eine geminale Kopplung, sowie eine vicinale Kopplung mit Proton 3. Fragment B dagegen zeigte ein komplizierteres Kopplungssystem, welches vergleichbar war mit dem von Alkohol 3. Damit war klar, daß zwei Methylengruppen benachbart stehen mußten.

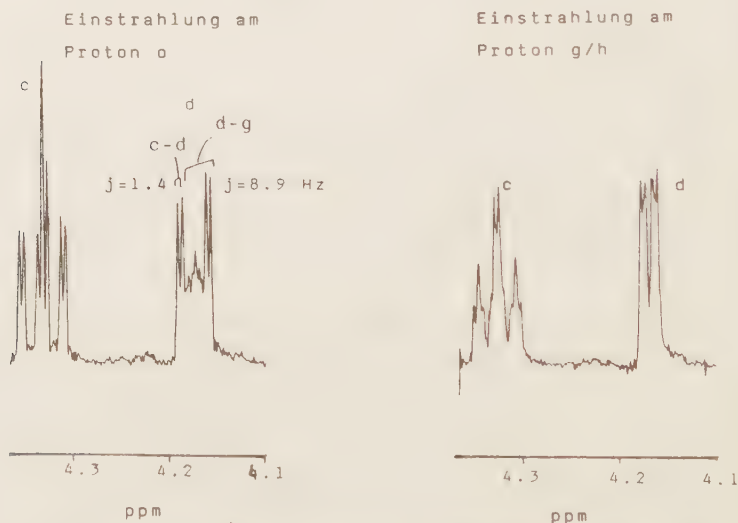


Abb. 37: Einstrahlexperimente zur Dokumentation der long-range Kopplung zwischen den Protonen c und d

* Zur Auswertung von Spektren komplizierter Spinsysteme kann man von Computern berechnete, simulierte Spektren einsetzen. Auf der Basis von geschätzten Ausgangsparametern für die chemische Verschiebung und die Kopplungen der beteiligten Kerne itiriert man, um das theoretische und das experimentelle Spektrum anzugleichen. Dafür wurden mehrere Rechenprogramme entwickelt (LAOCOON etc.). Stimmt das gemessene und das berechnete Spektrum in Lage und Intensität genau überein, dann kann man aus dem berechneten Spektrum direkt den gultigen Parametersatz entnehmen (151).

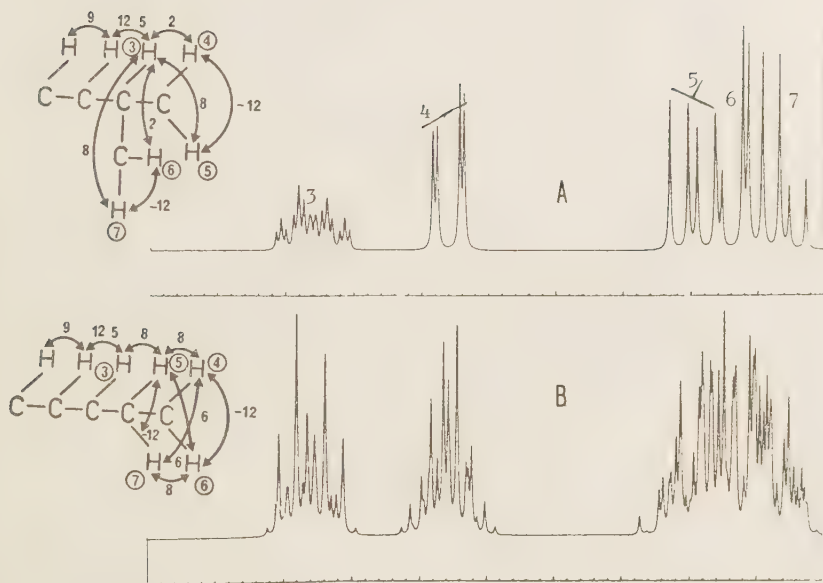
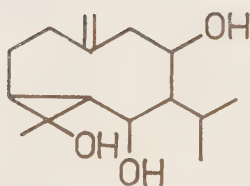


Abb. 38: Simulationsspektren der Fragmente A und B

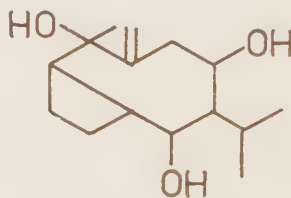
Für Verknüpfung der 14 Kohlenstoffe verblieben die vier in Abb. 39 gezeigten theoretisch möglichen Strukturen I, II, III und IV.

Die Strukturen I und II schieden aus, da keine Signale bei hohem Feld auftraten, welche für 3- und 4-gliedrige Ringe typisch sind. Struktur III war ebenfalls nicht möglich, weil sie die großen Kopplungskonstanten ($J = 9.4$

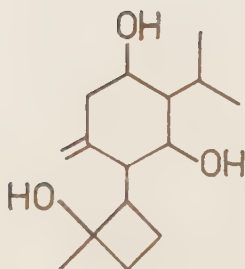
und $J = 12.9$) zwischen d-g und g-h, sowie die beobachteten NOEs zwischen h-o und g-j nicht erklären würde. Auch mit einer anderen Konformation wären die großen Kopplungskonstanten zwischen d-g und g-h, sowie die NOEs zwischen g-e und e-g nicht in Einklang.



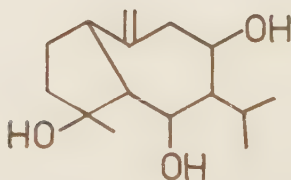
I



II



III



IV

Abb. 39: Theoretisch mögliche Strukturen von Alkohol 3

Die Struktur IV (Abb. 40) dagegen würde sowohl die ^1H -Kopplung zwischen d und c ($J = 1.4$) als auch die großen Kopplungskonstanten zwischen d-g ($J = 9.4$) und g-h ($J = 12.9$) und alle ringbedingten Kopplungen erklären. Sie wurde deshalb als die einzig richtige für Alkohol 3 angenommen. Es handelt sich um eine Pseudoguajanstruktur mit exozyklischer Doppelbindung und einer tertiären sowie zwei sekundären alkoholischen Gruppen.

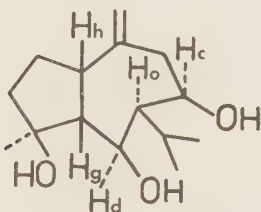


Abb. 40: Dihydroxynardol (Alkohol 3)

Um im ^{13}C -NMR-Spektrum die Kohlenstoffatome zuzuordnen, wurden selektive ^{13}C -H Entkopplungsexperimente* unternommen (Abb. 41). Wir konnten auf diese Weise die Positionen von C-1, C-2, C-7, C-9 und C-10 festlegen. Durch Irritation der Protonen k, l, m und j konnten wir C-1 und C-2 unterscheiden. Die Position von C-7 wurde durch Irritation von Proton c festgestellt. Alkohol 3 stellt somit das neue 6,8-Dihydroxy-Derivat von NARDOL dar, Nardol wurde von SASTRY (139) aus *Nardostachys jatamansi* isoliert und ist ein Guajanderivat.

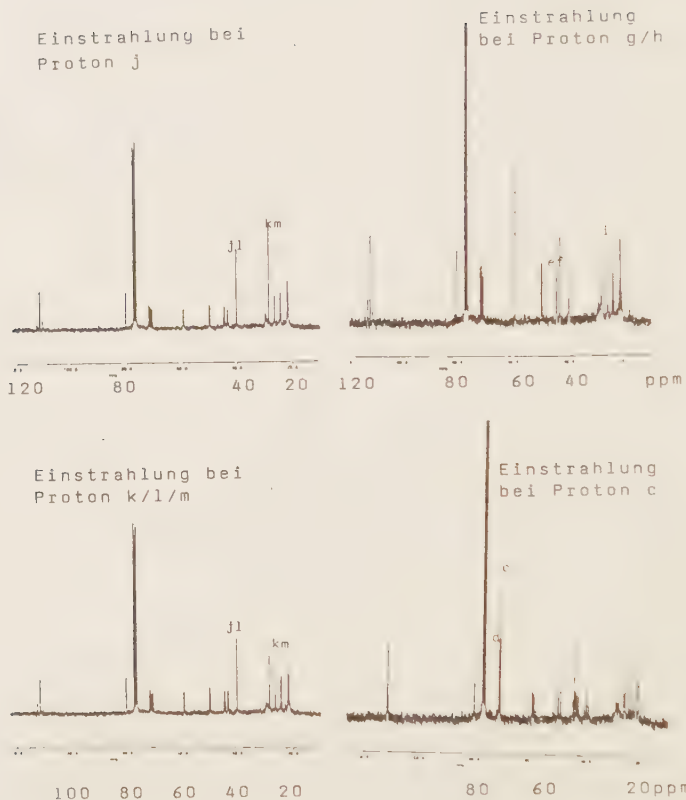
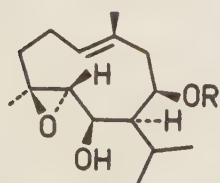


Abb. 41: Selektiv H-entkoppelte ^{13}C -Spektren

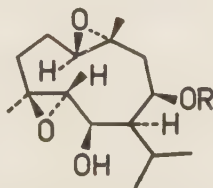
- * In der ^1H -Kernresonanz ist die Protonenentkopplung ein Spezialexperiment, das der Signalzuordnung bei schwierigen Strukturproblemen vorbehalten ist. ^{13}C -NMR-Spektren werden dagegen routinemäßig protonbreitbandentkoppelt aufgenommen. Man kennzeichnet diese Aufnahmetechnik häufig mit " ^{13}C -H "NMR (Proton Noise Decoupling)". Man kann ein heteronukleares Doppelresonanz-Experiment auch durchführen, indem man selektiv bei einer einzigen Protonen-Resonanz-Frequenz einstrahlt. Im ^{13}C -Spektrum verschwinden dann lediglich die auf diese Protonensorte zurückgehenden ^{13}C -H Kopplungen. Für die übrigen ^{13}C -Kerne hat man off-Resonanz-Bedingungen; d.h man erzielt Multipletts mit reduzierten Kopplungskonstanten. Die selektive Entkopplung (single frequency experiment) setzt voraus, daß die Protonensignale nicht zu dicht beieinander liegen (151).

IV.6 Stellung der Esterverknüpfung der Ester 1, 2a, 2b und 3

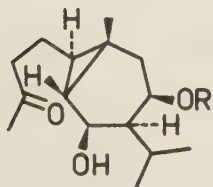
Die Stellung der Esterbindung konnten wir durch Vergleich der ^1H -NMR Spektren von Ester 1 und Alkohol 1 festlegen. Die Signale für H-6 und H-8 erschienen für Ester 1 bei 5.5 ppm bzw. 3.70 ppm. Nach Hydrolyse verschob sich Proton 8 zu höherem Feld (4.35 ppm) und H-6 blieb unverändert (vgl. Abb. 16). Auch die Protonen 9a und 9b verschoben sich zu höherem Feld. Diese Experimente bewiesen, daß die Esterfunktion an der Hydroxylgruppe am C-8 sitzt. Auch für Ester 2a, 2b und 3 konnten wir auf diese Weise die Lage der Esterbindung beweisen, so daß den Verbindungen nachstehende Strukturen zukommen: (Abb. 42).



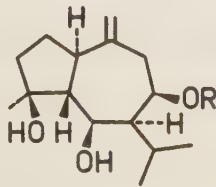
Cinnamoyl-Echinadiol



Cinnamoyl-Epoxyechinadiol



Cinnamoyl-Echinaxanthol



Cinnamoyl-Dihydroxynardol

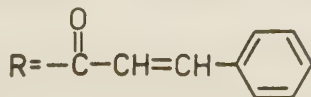
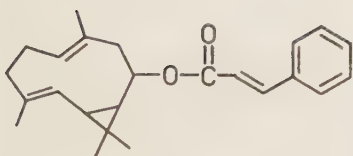
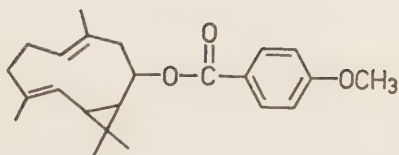


Abb. 42: Sesquiterpenester aus *Parthenium intigrifolium*

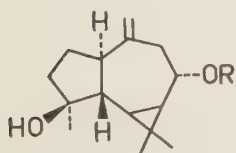
Von Rodriguez (154) wurde bereits früher auf die Anwesenheit von Sesquiterpen-Zimtsäureestern in *Parthenium integrifolium* hingewiesen, ohne sie näher zu identifizieren. Aus *Parthenium argentatum* wurden zwei Sesquiterpene (Guayulin A und B) isoliert, die mit Zimtsäure bzw. p-Methoxybenzoesäure verestert sind und ebenfalls ein Germacrangrundgerüst besitzen (97,152,155). Kürzlich konnte die absolute Konfiguration von Guayulin A ermittelt werden (156). Als wesentlicher Unterschied zu den von uns isolierten Germacranderivaten zeigte sich, daß die Hydroxylgruppe am C-8 bei Guayulin A α -ständig ist, und die Methylgruppen in Stellung C-4 und C-10 syn-orientiert sind. Von Rodriguez und Mitarb. (157) wurden jüngst zwei weitere Verbindungen (Guayulin C und D) isoliert, die die Zimtsäure bzw. Anissäureester eines Aromadendrendiols darstellen, welches Ähnlichkeit mit dem von uns isolierten Dihydroxynardol besitzt. Der wesentliche Unterschied ist, neben der Cyclopropangruppe, die α -Stellung der Estergruppe. Damit ergibt sich in *Parthenium argentatum* und *Parthenium integrifolium* ein ähnlicher Biosyntheseverlauf, der sich lediglich in gewissen strukturellen Merkmalen der Grundkörper unterscheidet. Die Sesquiterpenlactone Tetraneurin E und C, welche von Yoshioka und Mitarb. (100) nachgewiesen wurden, und zur Klasse der Pseudoguajanolide zählen, besitzen ebenfalls strukturelle Ähnlichkeit, konnten aber später von Herz und Mitarb. (96) in einer anderen Herkunft von *Parthenium integrifolium* nicht mehr aufgefunden werden (Abb. 43).



Guayulin A



Guayulin B



Guayulin C $R = -COCH=CHC_6H_5$

Guayulin D $R = -COC_6H_4OCH_3$

Aromadendrenediol $R = -H$

Abb. 43: Sesquiterpenverbindungen aus *Parthenium argentatum*

V. Pharmakologische Untersuchungen der Sesquiterpenester aus *Parthenium integrifolium*

V.1 Beschreibung der verwendeten Testsysteme

Zur Lokalisierung und Anreicherung von Verbindungen mit immunstimulierender Wirkung verwendeten wir als in vitro-Testsystem den Granulozytentest nach BRANDT (140) und als in vivo-Testsystem den Carbon-Clearance-Test nach BIOZZI (141). Außerdem wurden die Virus-hemmende Wirkung und in verschiedenen Test-Modellen weitere Einflüsse auf das unspezifische Abwehrsystem untersucht (149).

V.1.1 Granulozyten-Test nach BRANDT

Die Aufnahme und der stufenweise Abbau von körperfremden und teilweise auch körpereigenen Stoffen, ein als Phagozytose bezeichneter Vorgang, wird zwei Zelltypen zugeschrieben, den Makrophagen und den neutrophilen Granulozyten.

Die Phagozytoseleistung der Granulozyten läßt sich nach einer von BRANDT entwickelten Methode messen. Dabei werden aus Humanserum angereicherte Granulozytenfraktionen mit Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) und der zu testenden Substanz für eine bestimmte Zeit inkubiert. Nach Fixierung und Anfärbung erfolgt die Auswertung. Aus der durchschnittlichen Anzahl von phagozytierten Hefepartikeln läßt sich der Phagozytose-Index ermitteln.

Die Ester Cinnamoyl-echinadiol, Cinnamoyl-epoxyechinadiol, Cinnamoyl-echinaxanthol und Cinnamoyl-dihydroxynardol steigerten die Phagozytoseleistung von menschlichen Granulozyten in vitro um bis zu 25% .

Abb. 44 zeigt, daß die maximale Aktivität im Konzentrationsbereich von 10^{-3} bis 10^{-4} mg/ml erreicht wird. Hohe Konzentrationen führten zu einer Verminderung der Phagozytoseleistung bzw. zu einer Suppression.

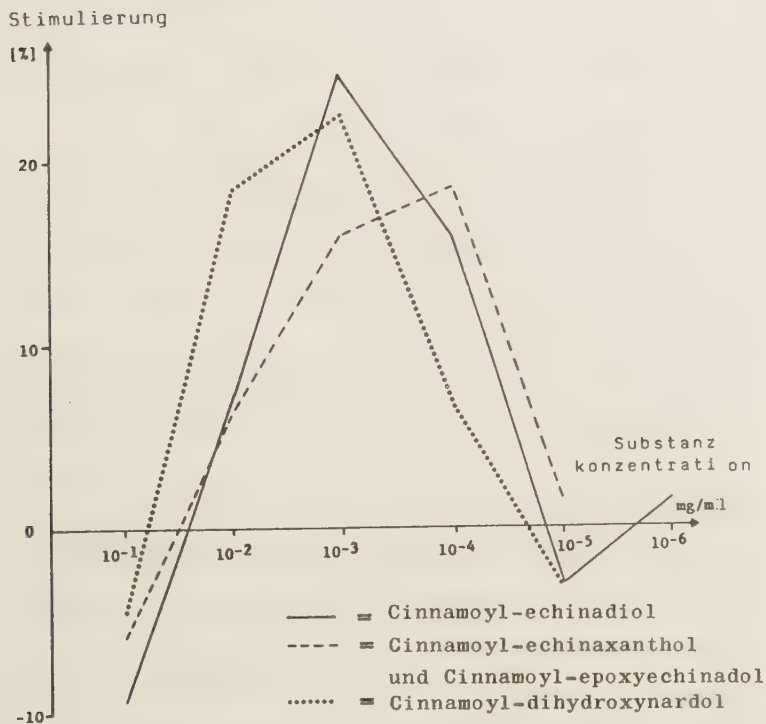


Abb. 44:
 Stimulierung der Phagozytose von menschlichen Granulozyten

V.1.2 Carbon-Clearance-Test nach BIOZZI

Mit Hilfe dieses Testes wird die Phagozytoseaktivität von Leber- und Milz-Makrophagen bestimmt. Dazu wird Mäusen Gelatine-stabilisierte Kohlesuspension intravenös injiziert, in bestimmten Zeitabständen aus dem retro-orbitalen Venenplexus Blut entnommen, und die Abnahme der Kohlekonzentration spektrophotometrisch verfolgt. An der Elimination der Kohlepartikel aus dem Blut sind in erster Linie die Kupfferschen Sternzellen der Leber und zu ca. 10% die Milzmakrophagen beteiligt.

Trägt man den Logarithmus der jeweiligen Extinktion (Kohlekonzentration im Blut) gegen die Zeit auf, so erhält man eine Gerade, deren negative Steigung, als Regressionskoeffizient K bezeichnet, ein Maß für die Phagozytoseaktivität darstellt. Appliziert man einer Versuchsgruppe von Tieren eine potentiell immunstimulierende Substanz und ermittelt anschließend die Carbon-Clearance, d.h. die Rate mit der die injizierten Kohlepartikel aus dem Blut eliminiert werden, so kann man durch Vergleich mit einer Kontroll-Gruppe auf die Phagozytosesteigerung durch die Testsubstanz schließen. Eine Stimulierung ist zu erkennen, wenn das Verhältnis $K_{\text{Substanz}}/K_{\text{Kontrolle}} > 1$ ist; eine Suppression liegt vor, wenn das Verhältnis < 1 ist. Die Beurteilung der Wirksamkeit erfolgt zusätzlich mit sogenannten DSK-Werten. Ist der Quotient der Regressionskoeffizienten > 1.5 , so wird der Substanz ein DSK-Wert von 2, d.h. eine starke Phagozytosestimulierung zugeschrieben. Ein Quotient von 1 bis 1.5 weist auf eine schwache Stimulierung hin und wird mit einer DSK-Note von 1 bewertet (142).

Abb. 45 zeigt, daß mit Cinnamoyl-echinadiol eine etwa doppelt/ so schnelle Elimination von Kohle erfolgt als bei der Kontrolle. Das Verhältnis der Regressionskoeffizienten von Substanz und Kontrolle war 1.9, was einer DSK-Note von 2 entspricht. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man davon ausgehen, daß die Sesquiterpen-Ester auf das unspezifische Immunsystem einen stimulierenden Einfluß ausüben.

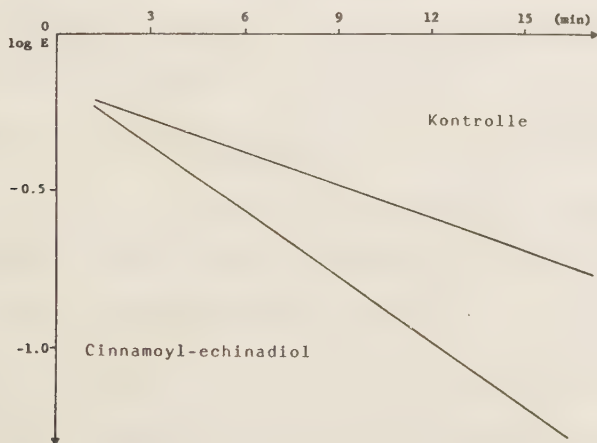


Abb. 45: Carbon-Clearance durch Cinnamoyl-echinadiol (Ester 1)

V.I.3 Antivirale Wirkung

Ester 1, 2 und 3 wurden im Plaque-Test (149) auf antivirale Wirkung getestet. Es zeigte sich folgendes Ergebnis:

Ester	Tox. Effekt	Therap. Effekt	
1	11	30	mm Hemmhof
2	12	27	mm Hemmhof
3	14	26	mm Hemmhof

Aus dem Farbttest errechnete sich folgende 50%-Hemmung:

Ester 1	2.43 µg/ml
Ester 2	1.84 µg/ml
Ester 3	1.47 µg/ml

V.1.4 Immun-Teste

Der Einfluß auf weitere Immunparameter wurde in folgenden Test-Modellen untersucht:

1. VSV-Test (in vivo-Nachweis einer Stimulierung der unspezifischen körpereigenen Abwehr)
2. Interferonstimulierungs-Test
3. Aujeszky Test (in vivo-Infektionsbelastungstest mit Aujeszky-Virus)
4. Lymphozytentransformationstest
5. NK-Test (Steigerung der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität)

Im VSV- und Interferonstimulierungs-Test zeigten sie keine Wirkung. Im "Aujeszky-Test" (149) zeigte Ester 1 eine schwache Wirkung bei Infektion mit dem Aujeszky-Virus, die sich allerdings nur wenig von der Wirkung der Blindprobe (Tween 80) unterschied.

Im Lymphozytentransformations-Test und im NK-Test (Steigerung der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität) übte Ester 1 eine stark suppressive Wirkung aus.

V.1.5 Wirkung gegen *Candida albicans**

Ester 1 zeigte gegen *Candida albicans* im Agar-Diffusions-Test keine Wirkung.

* Für die Durchführung danken wir Alice M. Clark (Assoc. Prof.) Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Univ. Mississippi, USA

VI. Isolierung neuer Polyacetylene aus Echinacea pallida

VI.1 Extraktion

1 kg pulverisierte Echinacea angustifolia Wurzel-Droge des Handels, die später aufgrund der Inhaltstoffe, als Echinacea pallida erkannt wurde, wurde mit Chloroform 24 Stunden in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert. Nach Einengen des Chloroform Extrakts unter vermindertem Druck verblieben 22 g öligler Rückstand.

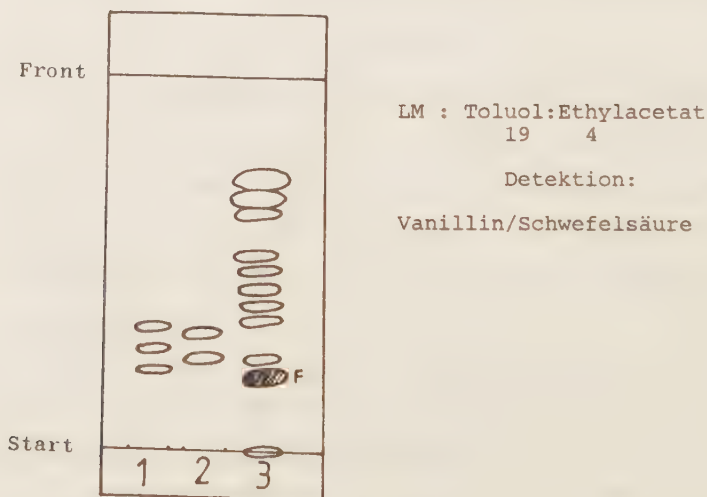
VI.2 Voruntersuchungen

VI.2.1 Dünnschichtchromatographie

Der Chloroformextrakt wurde dünnschichtchromatographisch untersucht und mit den Extrakten von Echinacea purpurea und Parthenium integrifolium verglichen. Im R_f-Bereich der für Parthenium integrifolium charakteristischen Sesquiterpenester waren bei Echinacea pallida und Echinacea angustifolia keine Substanzen nachweisbar. Abb. 46 zeigt das Dünnschichtchromatogramm der Chloroform-Extrakte von Echinacea pallida, Echinacea purpurea und Parthenium integrifolium. Der Extrakt von Echinacea pallida zeigt nach Detektion mit Vanillin/Schwefelsäure Zonen im R_f-Bereich 0.25-0.7. Fleck F bei R_f 0.25, eine der Hauptkomponenten färbte sich mit Vanillin/Schwefelsäure schwach grau an. Die Zone liegt knapp unterhalb von β -Sitosterin.

VI.2.2 Analytische HPLC

Für die analytische HPLC verwendeten wir dasselbe System, das wir bei den Extrakten von *Echinacea purpurea* bzw. *Parthenium integrifolium* eingesetzt hatten. Die Detektion erfolgte mittels Photodiodenarray. Das Chromatogramm des Chloroformextrakts sowie die on-line aufgenommenen UV-Spektren sind in Abb.47 wiedergegeben. Beide Hauptpeaks bei 5.8 min und 7.2 min lieferten UV-Spektren, die auf Acetylenstrukturen hindeuteten. Sie waren auch in praktisch allen untersuchten Handelsmustern von "*Echinaceae angustifoliae radix*" nachzuweisen.



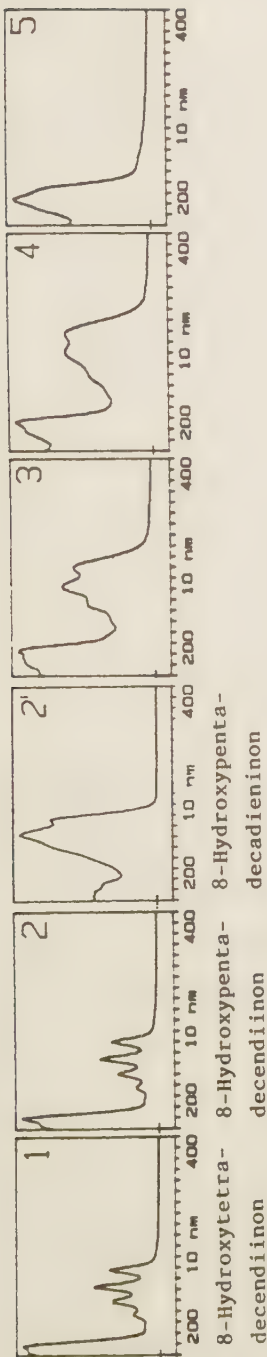
1 = Chloroformextrakt von *Parthenium integrifolium*

2 = Chloroformextrakt von *Echinacea purpurea*

3 = Chloroformextrakt von *Echinacea pallida*

F = Fraktion F

Abb. 46: DC-Vergleich der Chloroformextrakte von *Echinacea pallida*, *Echinacea purpurea* und *Parthenium integrifolium*



inj. vol. 10 μ l
 mobile ph. A: Wasser B: MeCN
 " 40% B-80% in 30 min
 " 1.0 ml/min

stat. ph. LiChrospher RP18, 5 μ

column Hibar 125-4

run no. 988

inj. time 17:52

atten (au) 100.0 (211.1)

zero 2%

signal A: 1.0 Set 0

flow length
 1. 210. 4
 2. 230. 4
 3. 254. 4
 4. 280. 20
 5. 320. 4
 6. 320. 20
 7. 430. 50
 8. 550. 100

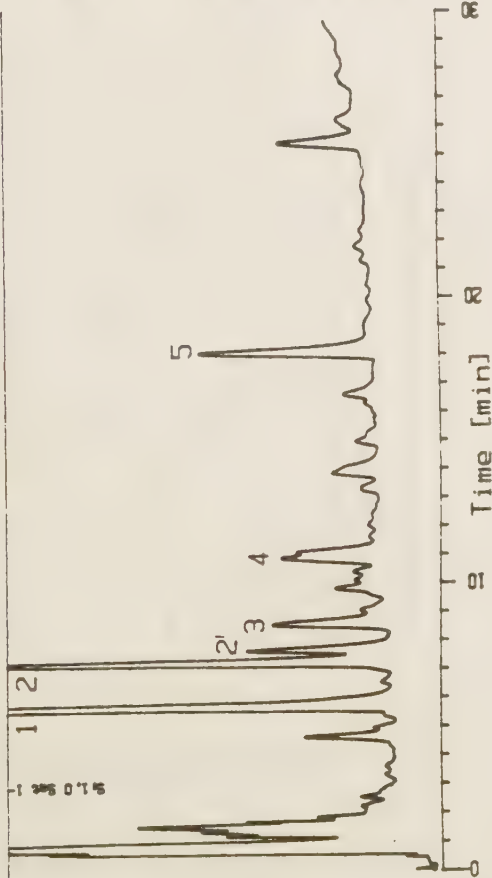


Abb. 47: HPLC-Fingerprint von *Echinacea angustifolia* (Handelsdroge)

VI.3 Säulenchromatographie

Zur Anreicherung der Hauptsubstanzen wurde der Chloroform-extrakt über eine Kieselgel-Säule vorgetrennt. Aus 9 g Chloroformextrakt erhielten wir bei Elution mit Toluol/Ethylacetat (19:4) folgende Fraktionen :

Fraktion	32-46	A	30 mg
Fraktion	47-54	B	30 mg
Fraktion	86-90	C	24 mg
Fraktion	113-118	D	60 mg
Fraktion	145-177	E	26 mg
Fraktion	291-400	F	200 mg



Abb. 48: Dünnschichtchromatographische Trennung der Fraktion F

Fraktion F wurde durch präparative DC im Laufmittel Toluol/Ethylacetat (7:3) nochmal gereinigt. Die anschließende Überprüfung mit analytischer HPLC ergab, daß sie aus den zwei Hauptverbindungen 1 und 2 bestand (vgl. Abb. 47). Es gelang nicht, die Verbindungen dünn-schicht-chromatographisch zu trennen (vgl. Abb. 48), weshalb wir für die weitere Reinigung die semipräparative HPLC einsetzten.

VI.4 Semipräparative HPLC

Wir führten sie mit einer "reversed-phase" Säule durch und verwendeten als Laufmittel 40%iges Acetonitril. Peak 1 erschien bei 23 min, Peak 2 bei 27 min. Sie wurden bei 210 nm detektiert und von Hand aufgefangen. Am Ende erhielten wir 10 mg Substanz 1 und 30 mg Substanz von Peak 2 (Abb. 49).

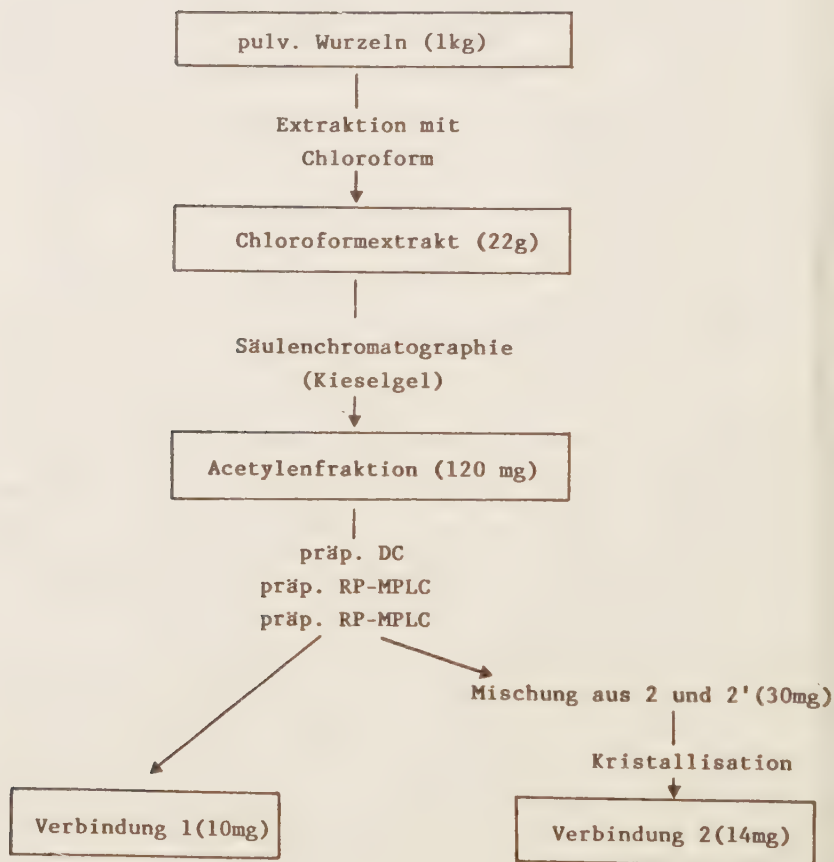


Abb. 49:
Isolierungsschema der Acetylenverbindungen

VII. Strukturaufklärung der Acetylenverbindungen

VII.1 Strukturaufklärung von Substanz 1

Substanz 1 wurde in öligler Form erhalten. Da die Verbindung sehr instabil war, bewahrten wir sie unter Stickstoff oder in Lösung auf. Das UV-Spektrum zeigte die typischen Banden einer Acetylen-Verbindung. Die Absorptionsmaxima erschienen bei 232, 250, 263 und 281 nm (Abb. 50), was auf eine Diin-en-Struktur hindeutete (145).

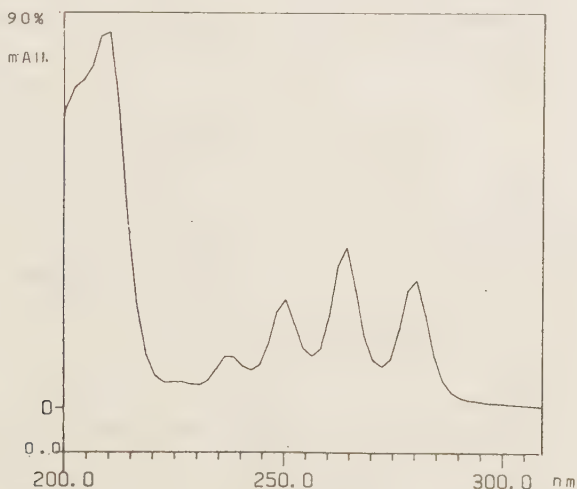


Abb. 50: UV-Spektrum von 8-Hydroxytetradeceindion (Substanz 1)

In einem bei 400 MHz aufgenommenem ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 51) zeigte Substanz 1 Methylprotonen bei 2.138 ppm und ein Signal bei 4.203 ppm, welches von einem CH-OH Proton stammte. Diese stimmten in der Lage mit der später beschriebenen Substanz 2 überein (Siehe S. 94). Signale von olefinischen Protonen erschienen bei 6.362 ppm und 5.742 ppm. Als Kopplungskonstante wurde 15.9 Hz gemessen, was bedeutete, daß die Bindung, ebenso wie in

Substanz 2 und 2', trans Konfiguration hatte. Folglich sollte die Kohlenstoffkette C1-C10 in Substanz 1, 2 und 2' identisch sein. Mit Hilfe des COSY-Spektrums konnten wir die koppelenden Protonen erkennen. Abb.52 zeigt, daß die Methyl-Protonen C1 kein direktes Nachbarproton besitzen und die Protonen an C-3,-4,-5 miteinander koppeln. Da das Proton an C-10 mit dem Proton an C-8, und das Proton an C-8 mit denen an C-7 und C-9 koppelt, besteht trans-Konfiguration für die olefinischen Protonen an C-9 und C-10. Die Kopplungen sind mit Strichen gekennzeichnet (Abb. 53).

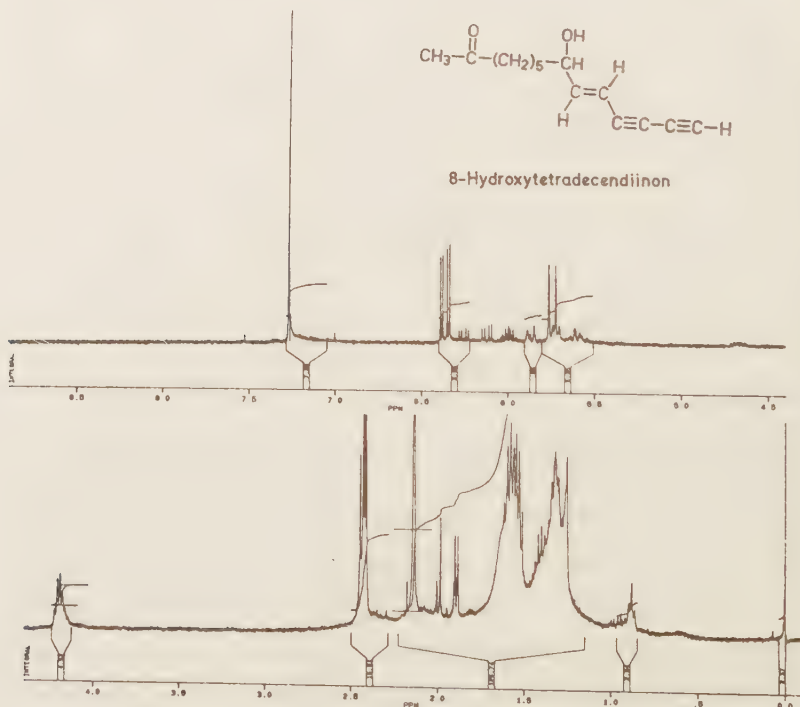
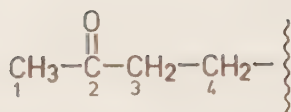


Abb. 51: ^1H -NMR Spektrum (400 MHz) von 8-Hydroxy-tetradeceidiinon (Substanz 1)

Aus der vergleichenden Auflistung der ^{13}C -NMR-Daten von Substanz 1 und 2 ist die große strukturelle Ähnlichkeit der beiden Verbindungen ersichtlich (Tab. 12). Aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum von Substanz 1 konnten wir allerdings die Zahl der Dreifachbindungen nicht ableiten, da die Signale der Acetylen-Kohlenstoffe im Bereich von 60-80 ppm sehr schwach ausgeprägt waren und mit den Signalen von Deuteriochloroform überlappten. Das Signal bei 70.98 ppm (vgl. Abb. 54) erschien in einem nicht C-H entkoppelten Spektrum als Dublett und besaß eine Kopplungskonstante, die typisch für eine endständige Dreifachbindung ist ($J = 258.4 \text{ Hz}$).

Tabelle 12: ^{13}C -NMR Vergleich von Substanz 1 und 2

	Substanz 1	Substanz 2
C 1	29.79 q	29.87 q
C 2	208.64 s	208.94 s
C 3	43.60 t	43.61 t
C 4	23.72 t	23.69 t
C 5	29.05 t	29.02 t
C 6	24.97 t	24.99 t
C 7	36.75 t	36.73 t
C 8	71.90 d	72.08 d
C 9	150.37 d	148.53 d
C 10	108.06 d	108.94 d
C 11	77.25	80.12 s
C 12		75.17 s
C 13	73.66	72.44 s
C 14	70.98 d	64.38 s
C 15	-----	4.58 q



8-Hydroxytetradecendiinon

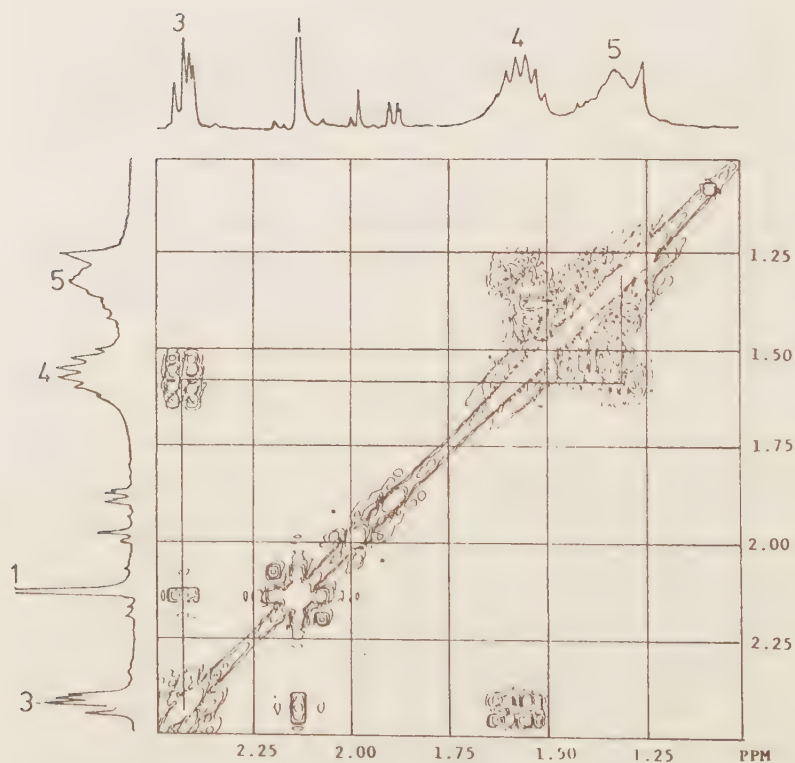
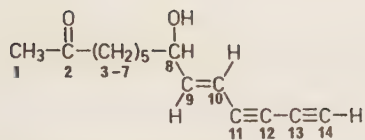


Abb. 52: 400 MHz-COSY-NMR-Spektrum von 8-Hydroxytetradecendiinon (Substanz 1)



8-Hydroxytetradecendiinon

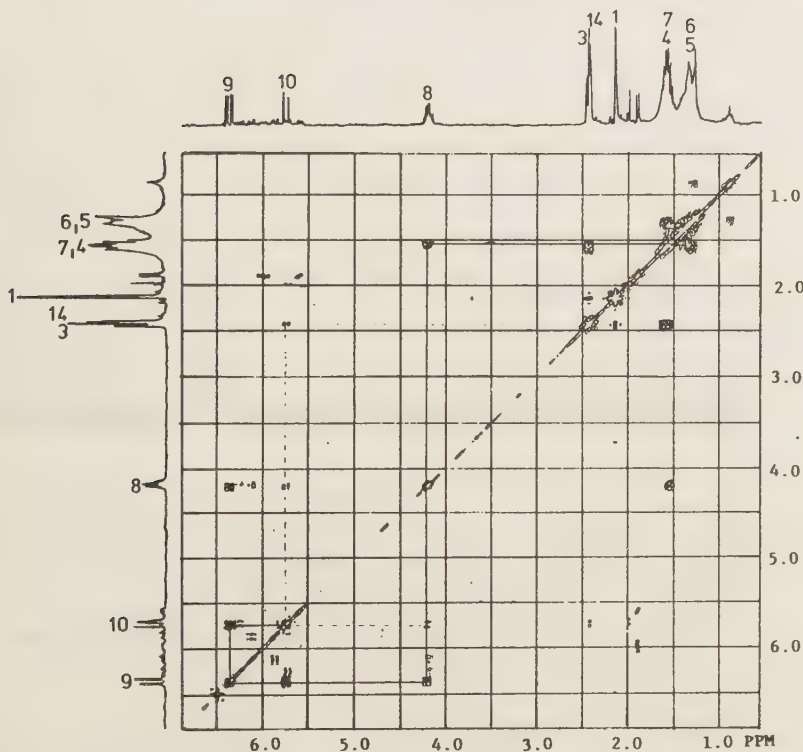
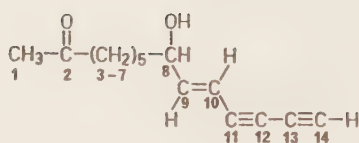


Abb. 53: 400 MHz-COSY-NMR-Spektrum von 8-Hydroxytetradecendiinon (Substanz 1)



8-Hydroxytetradecendiin-2-on

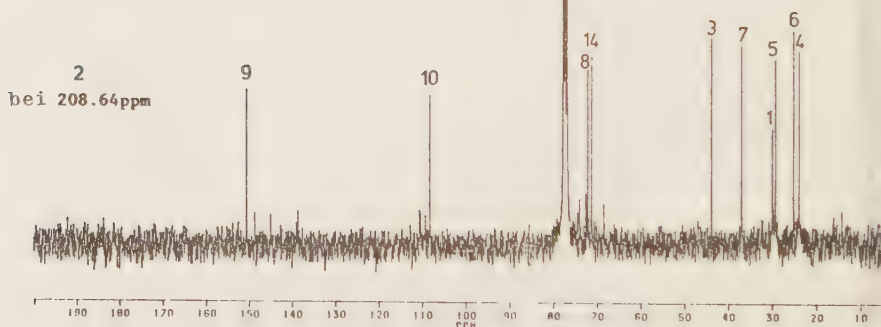


Abb. 54: 75 MHz ^{13}C -NMR Spektrum von
8-Hydroxytetradecendiinon (Substanz 1)

Aus dem UV-Spektrum konnten wir wegen des charakteristischen Abstandes der Banden bei von $5.5 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$ ableiten, daß es sich um 2 Dreifachbindungen und eine konjugierte Doppelbindung, wie in Verbindung 2 handeln mußte. Damit hat Verbindung 1 die Struktur eines 8-Hydroxy-tetradeca-9E-en-11,13-diin-2-ons. Diese Verbindung ist bisher nicht beschrieben worden.

VII.2 Strukturaufklärung der Verbindungen 2 und 2'

Substanz 2 wurde zunächst zusammen mit 2' als gelbes Öl erhalten. Nach mehrtägigem Stehen unter Stickstoff in Chloroform kristallisierte Verbindung 2 aus der Mischung aus. Beide Verbindungen waren unter Stickstoff stabiler als Substanz 1. Das mit dem Photodiodenarray-Detektor aufgenommene UV-Spektrum von Substanz 2 zeigte Maxima bei 232, 250, 263 und 281 nm, was wiederum für eine Acetylenverbindung mit Diin-en-Struktur sprach (144). Das IR-Spektrum der Mischung zeigte charakteristische Signale bei 3390 cm^{-1} (OH), 2200 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{C}$) und 1700 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$). Banden bei 950 cm^{-1} und 720 cm^{-1} wiesen auf die Anwesenheit einer trans-olefinischen Doppelbindung hin (Abb. 55). Im Massenspektrum ergab Verbindung 2 einen Molekülpeak bei 234 m/z entsprechend einer Summenformel von $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$.

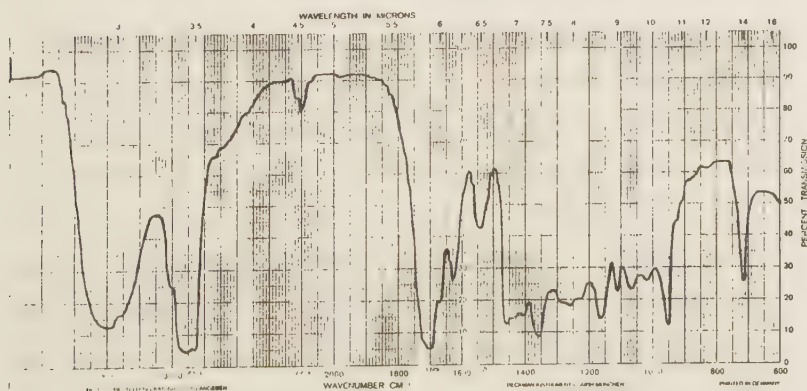


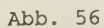
Abb. 55: IR-Spektrum von Fraktion F

VII.2.1 Strukturaufklärung von Substanz 2

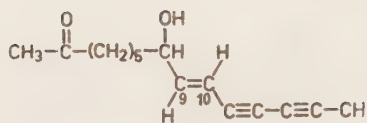
Das IR-Spektrum zeigte charakteristische Banden bei 3390 cm^{-1} , 1700 cm^{-1} und 950 cm^{-1} , die für eine Hydroxyl-, eine Carbonylfunktion und eine trans-verknüpfte Doppelbindung sprachen. Im ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 56) erschienen 2 Methylgruppen bei 2.13 und 1.98 ppm, die benachbart zu einer Carbonylgruppe bzw. zu einem ungesättigten System stehen mußten. Ein CH-OH Proton erschien bei 4.16 ppm und koppelte mit den Protonen von C-10 und C-9. Olefinische Protonen erschienen bei 6.25 ppm und 5.71 ppm. Die Signale zwischen 1.3 und 1.6 ppm konnten den miteinander koppelnden aliphatischen Protonen zugeordnet werden. Das COSY-Spektrum (Abb. 57) zeigte die Kopplung der olefinischen Protonen H-10 und H-9. Die große Kopplungskonstante (15.9 Hz) sprach für eine trans-Verknüpfung. Die Methyl-Protonen am C-15 zeigten eine long-range-Kopplung mit H-10.

Das nicht entkoppelte ^{13}C -NMR-Spektrum (Abb. 58) zeigte zwei Kohlenstoffatome als Quartetts, fünf Kohlenstoffatome als Triplets, drei als Dubletts und fünf als Singulets. Die Methyl-Kohlenstoffe waren bei 29.87 und 4.58 ppm, die quarternären Kohlenstoffe im Bereich von 60-80 ppm zu erkennen, was darauf hinwies, daß diese Singulets von Acetylen-Kohlenstoffen stammten. Das fünfte Singulett erschien bei 208.9 ppm und entsprach einer C=O Gruppe.

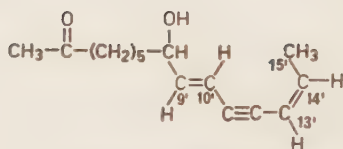
Als Struktur schlagen wir aufgrund dieser Daten 8-Hydroxy-pentadeca-9E-en-11,13-diin-2-on vor, eine Acetylenverbindung die bisher nicht bekannt war.



95



8-Hydroxypentadecadiinon



8-Hydroxypentadecadieninon

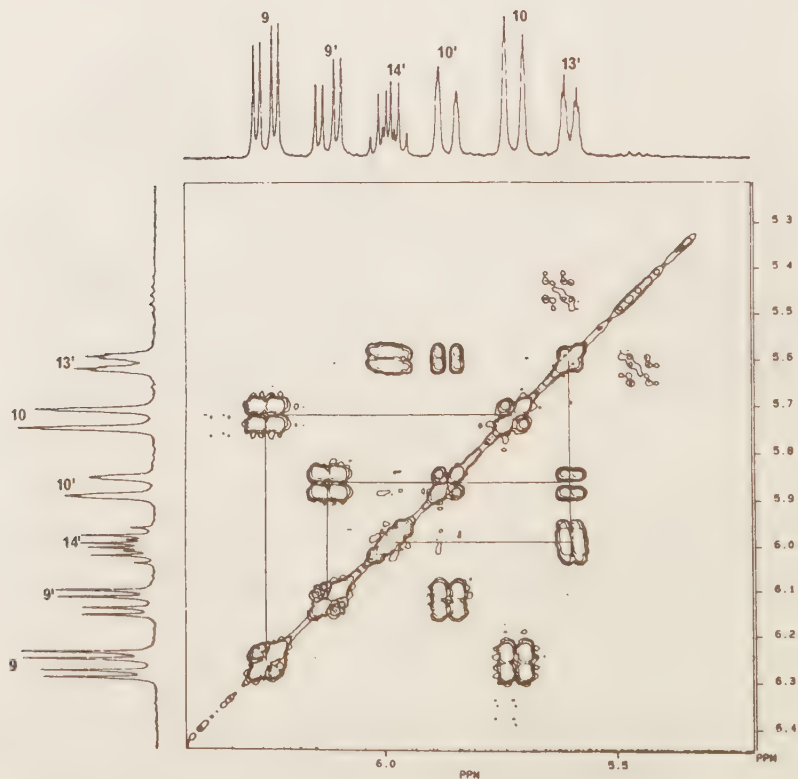
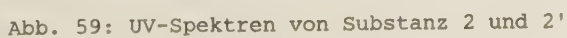
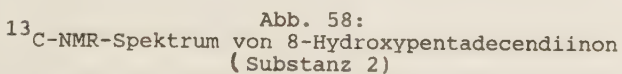


Abb. 57: 400 MHz-COSY-NMR Spektrum der Mischung aus Substanz 2 und Substanz 2' (Bereich der olefinischen Protonen)

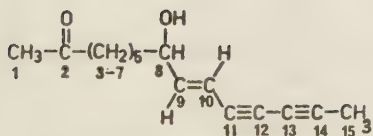
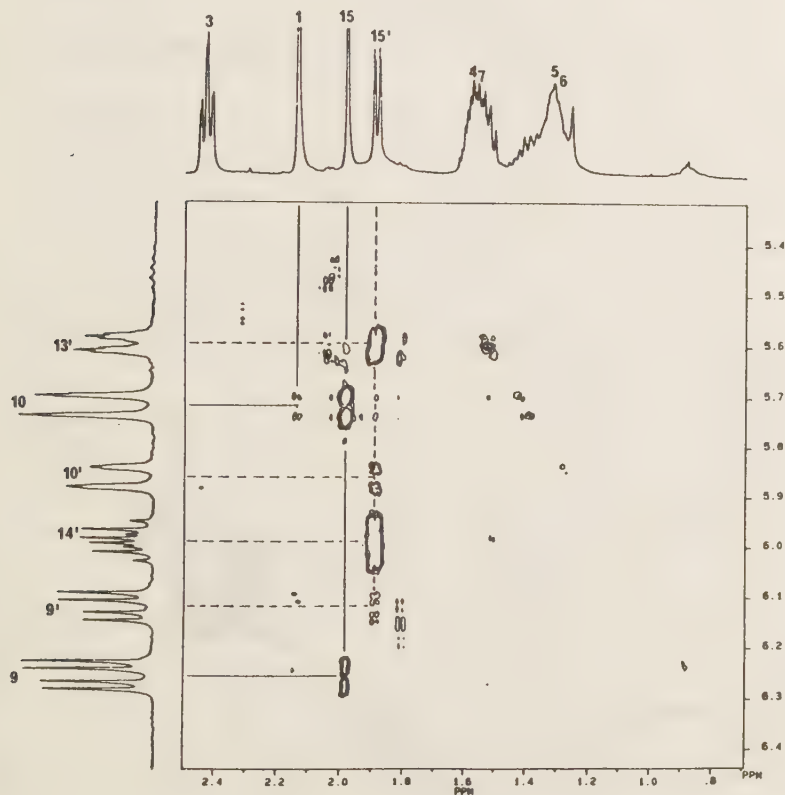


VII.2.2 Strukturaufklärung von Substanz 2'

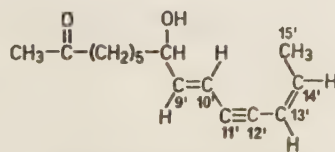
Substanz 2' konnte mit HPLC nur als (1:1)-Mischung mit Substanz 2 erhalten werden. Nachdem die Strukturaufklärung von 2 erfolgt war, konnten wir durch Vergleich der Spektren der Mischung mit denen der reinen Verbindung 2 die Signale für 2' zuordnen.

Das UV-Spektrum wurde bei der HPLC-Trennung on-line mit dem Diodenarray-Detektor aufgenommen (Abb. 59). Es zeigte ein Maximum bei 260 nm. Im ^1H -NMR-Spektrum der Mischung (Abb. 56) mußten die Signale bei 6.12 ppm, 5.87 ppm, 5.59 ppm und 5.98 ppm von Substanz 2' stammen, die folglich zwei Doppelbindungen besitzen sollte. Die Zugehörigkeit der unterschiedlichen olefinischen Protonen zu Substanz 2 bzw. 2' wird auch in Abb. 57 deutlich. Es ist klar zu sehen, daß das Proton H-10 nur mit H-9 koppelt (Substanz 2), während H-10' mit H-9' und H-13' koppelt (Substanz 2'). Die Doppelbindung von C-13/14 sollte cis verknüpft sein ($J=10.7$ Hz). Der Unterschied zwischen beiden Verbindungen ist auch aus Abb. 60 ersichtlich. Während die Methylprotonen von C-15 von Verbindung 2 nur mit den Protonen H-9 und H-10 koppelten, koppelt H-15' (Verbindung 2') mit H-9', H-10', H-13' und H-14'. Andererseits geht aus Abb. 61 hervor, daß beide Moleküle von C-1 bis C-8 dasselbe Strukturfragment aufweisen. Folglich stellt Verbindung 2' das 13,14-Dihydroderivat von Verbindung 2 dar und kann als 8-Hydroxypentadeca-9E,13Z-dien-11-in-2-on beschrieben werden (153). Diese Struktur war bisher ebenfalls nicht bekannt. Aus *Echinacea angustifolia* wurde von Jacobson (146) Echinolon isoliert, ein 10-Hydroxy-4,10-dimethyl-

dodeca-4E,11E-dien-2-on, das eine strukturelle Verwandtschaft zu den von uns isolierten Verbindungen aufweist.

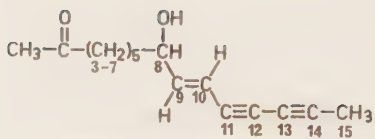


8-Hydroxypentadecadienon

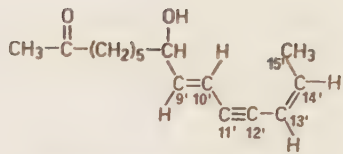


8-Hydroxypentadecadienon

Abb. 60: 400 MHz-COSY-NMR-Spektrum der Mischung aus Substanz 2 und Substanz 2'



8-Hydroxypentadecadiinon



8-Hydroxypentadecadieninon

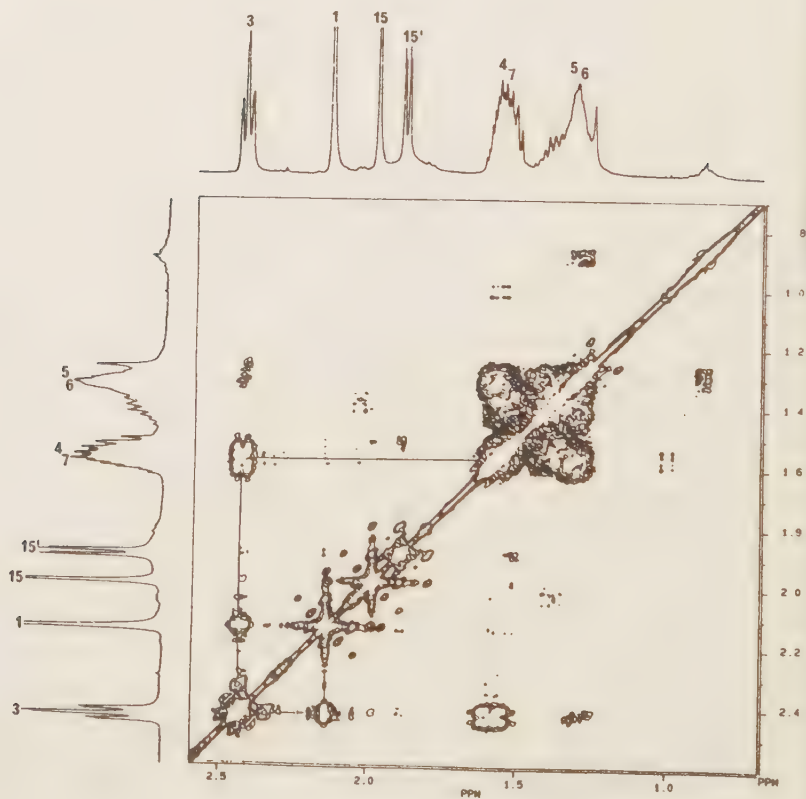


Abb. 61: 400 MHz-COSY-NMR-Spektrum der Mischung aus Substanz 2 und Substanz 2'

Bei der Analyse von Frischpflanzen-Auszügen stellten wir fest, daß diese Acetylenverbindungen genuin nicht vorkommen. An ihrer Stelle traten mehr unpolare Komponenten auf, die auch im ätherischen Öl enthalten sind und bisher noch nicht identifiziert wurden (Abb. 62). Bei Lagerungsversuchen mit pulverisierter Droge zeigte sich, daß schon nach relativ kurzer Zeit die Acetylenverbindungen 1 und 2 entstehen, und nach ca. 8 Tagen in relativ hoher Konzentration vorliegen. Folglich muß es sich bei den identifizierten Acetylenverbindungen um Artefakte handeln, die erst bei der Lagerung auftreten.

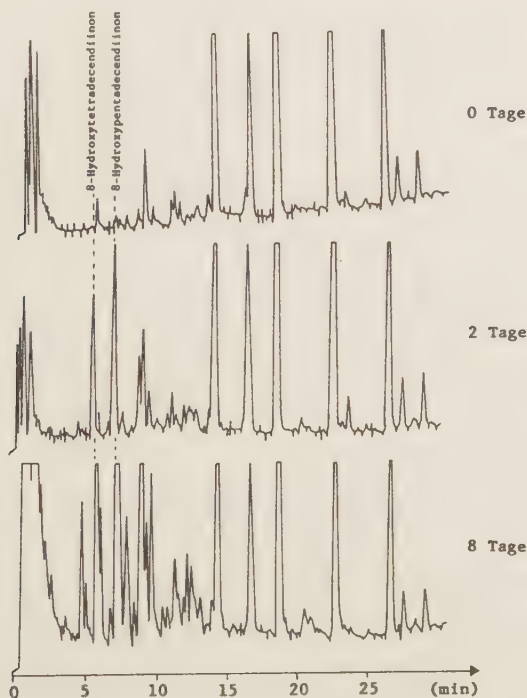
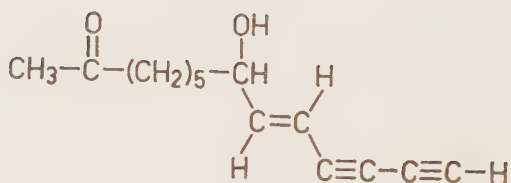
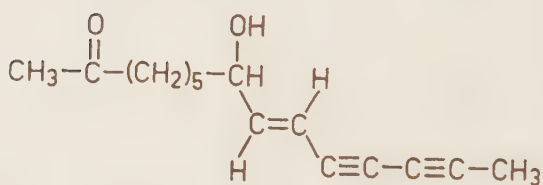


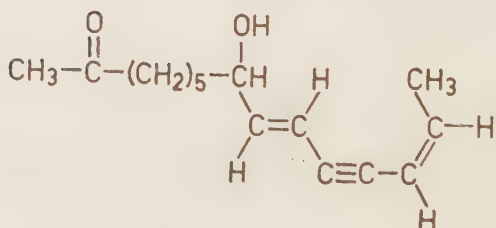
Abb. 62: Bildung von Artefakten bei der Lagerung von *Echinacea pallida* Wurzel



8-Hydroxytetradecendiinon



8-Hydroxypentadecendiinon



8-Hydroxypentadecadieninon

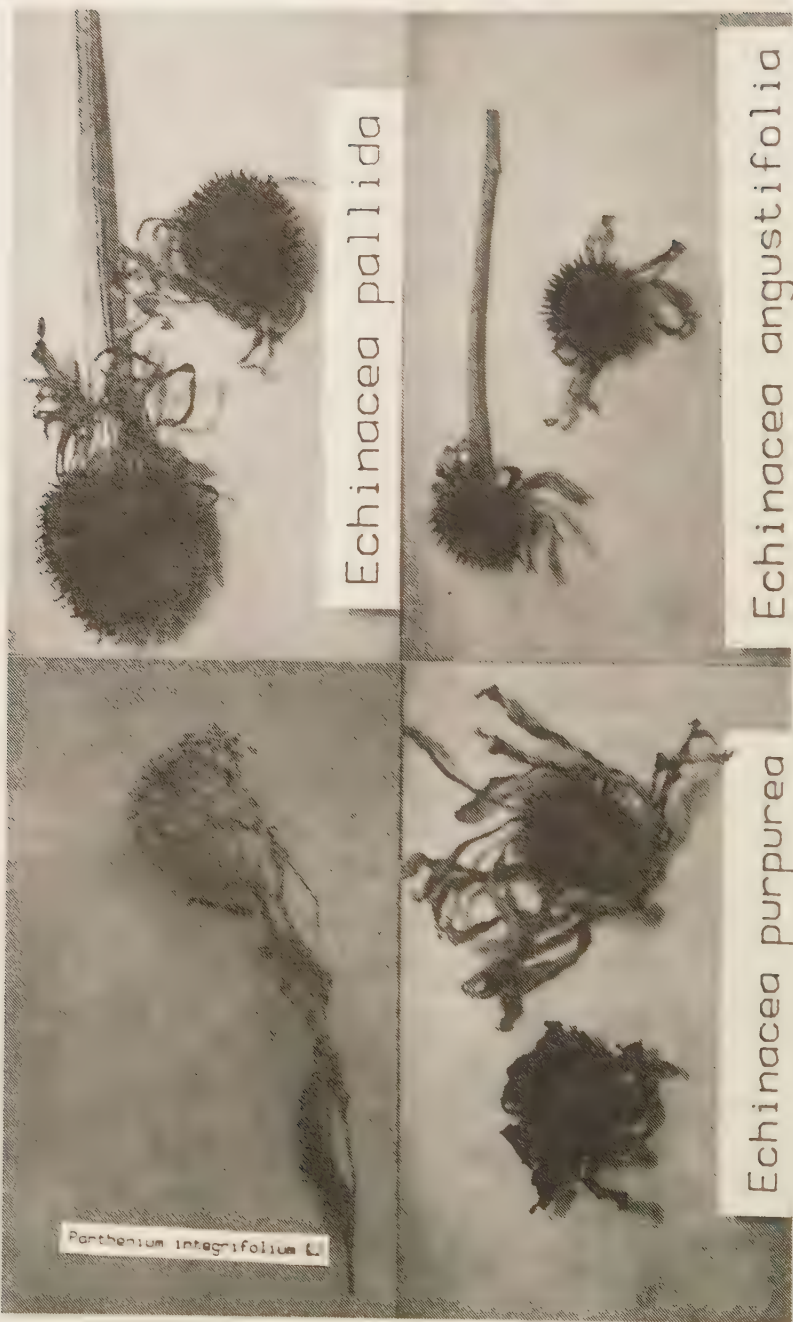
Abb. 63:

Neue Verbindungen aus *Echinacea pallida*

VIII. Zur Verfälschung von Echinacea purpurea Wurzeln mit Parthenium integrifolium Wurzeln

Zu Beginn unserer Arbeiten verwendeten wir ausschließlich Handelsdroge von Echinaceae purpureae radix. In allen von uns untersuchten Chargen waren die beschriebenen Sesquiterpenester nachzuweisen. Auch eine aus den USA erhaltene Probe zeigte dasselbe Inhaltsstoffmuster. Diese Sesquiterpenester wurden in der Folge von uns isoliert und in ihrer Struktur geklärt (128).

Die spätere Beobachtung, daß in frischgeernteten authentischen Echinacea purpurea-Wurzeln die Sesquiterpenester nicht nachweisbar waren, und ein Hinweis aus den USA (147) führte zu dem Schluß, daß die Handelsdroge offenbar in einem großen Maß verfälscht wird. Durch Vergleich von "Echinacea purpurea" Handelsdroge mit Parthenium integrifolium Wurzeln aus dem Herbar der Botanischen Staatssammlung in München, sowie authentischen Wurzeln aus den USA konnten wir beweisen, daß die untersuchten Handelsdrogen, die durchweg Importware aus den USA darstellten, mit Parthenium integrifolium verfälscht waren. Der Grund für die Verfälschung liegt möglicherweise in dem gemeinsamen Trivialnamen der beiden Drogen ("Missouri snake root") (146). Das unterschiedliche Aussehen der beiden Wurzeln und die auffälligen Unterschiede im Habitus der Pflanzen schließen aber eine zufällige Verwechslung aus. Nach unseren jetzigen Erkenntnissen stehen nachfolgend beschriebene Möglichkeiten zur Verfügung, die Verfälschung mit einfachen Mitteln zu erkennen.



Echinacea pallida



Echinacea purpurea



Echinacea angustifolia



VIII.1 Morphologische Untersuchung

Echinacea purpurea (L.) Moench hat einen bräunlichen, rhizomartigen Wurzelstock mit zahlreichen tiefgehenden faserartigen Wurzeln, während *Parthenium integrifolium* L. eine schwärzliche, knollig verdickte Wurzel mit dünnen Nebenwurzeln besitzt. *Parthenium integrifolium*-Wurzeln zeigen deutliche Phytomelanineinlagerungen, die die Wurzel fast schwarz erscheinen lassen, während *Echinacea purpurea* diese Einlagerungen nicht aufweist (Tab. 13). Die oberirdischen Teile der Pflanzen sind kaum zu verwechseln, da *Parthenium* kleine köpfchenförmige Blüten besitzt, wie Abb. 64/65 zeigt.

Tab. 13: Morphologische Unterschiede der Wurzeln

<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench	<i>Parthenium integrifolium</i> L.
bräunlicher, rhizomartiger Wurzelstock mit tiefgehenden faserartigen Wurzeln	schwärzliche, knollig verdickte Wurzel mit dünnen Nebenwurzeln
keine Phytomelanineinlagerung	deutliche Phytomelanineinlagerungen
kaum Sklerenchymfasern	lange (200-300 μ m) Sklerenchymfasern

VIII.2 Chromatographischer Vergleich

DC-Untersuchungen mit sechs authentischen Wurzeln unterschiedlicher Herkunft haben gezeigt, daß Cinnamoyl-echinadiol, Cinnamoyl-epoxyechinadiol, Cinnamoyl-echinaxanthol und Cinnamoyl-dihydroxynardol in *Echinacea purpurea* Wurzeln nicht vorkommen. Folglich ist das Auf-

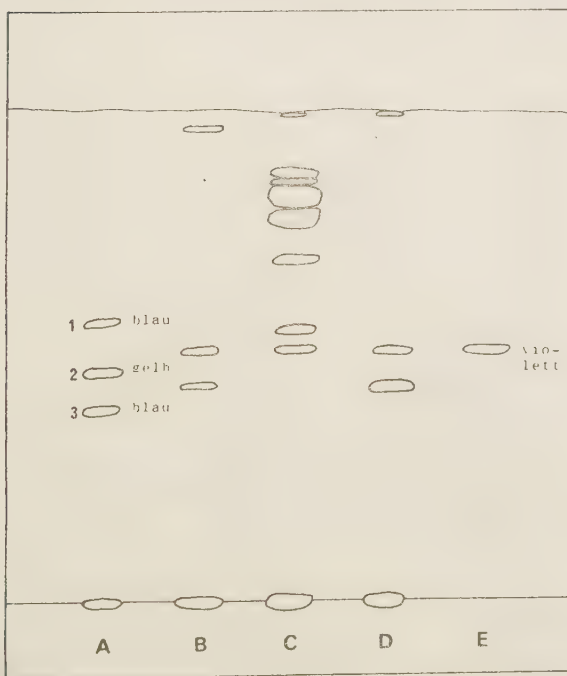
treten der blauen bzw. gelben Zonen bei Rf 0.4-0.6 im DC des Methanol- bzw. Chloroformextraktes ein Indiz für eine Verfälschung mit *Parthenium integrifolium*-Wurzeln. *Echinacea purpurea* Wurzeln zeigen lediglich eine bräunlich-graue Zone knapp unterhalb von β -Sitosterin (vgl. Abb 66).

Abb. 66
DC der Chloroformextrakte der Wurzeln

- | | |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| A = <i>Parthenium integrifolium</i> | 1 = Cinnamoyl-echinadiol |
| B = <i>Echinacea purpurea</i> | 2 = Cinnamoyl-epoxyechinadiol |
| C = <i>Echinacea pallida</i> | und Cinnamoyl-echinaxanthol |
| D = <i>Echinacea angustifolia</i> | 3 = Cinnamoyl-dihydroxynardol |
| E = β -Sitosterin | |

Toluol:Ethylacetat (7:3)

Detektion: Vanillin/Schwefelsäure



Mit der HPLC werden die Unterschiede noch klarer. Die Fingerprints der Chloroformextrakte von *Echinacea purpurea* und *Parthenium integrifolium* Wurzeln zeigen deutliche Unterschiede: Während *Parthenium integrifolium* in erster Linie die Peaks 1-4 der Sesquiterpenester enthält, die, ebenso wie die übrigen Peaks, das typische UV-Spektrum der Zimtsäure aufweisen, liegen die Hauptpeaks von *Echinacea purpurea* im Retentionszeitbereich von 8-14 min und zeigen gänzlich andere UV-Spektren. Möglicherweise handelt es sich dabei um Acetylenverbindungen oder Isobutylamide (Abb. 67). Auch im Gaschromatogramm des ätherischen Öls der Wurzeln zeigen sich Unterschiede (Abb. 68).

Eine Prüfung von *Echinaceae purpureae radix* auf Verfälschung mit *Parthenium integrifolium* sollte in Zukunft obligatorisch sein.

Sesquiterpen-
kohlenwasserstoffe

Sesquiterpen-
alkohole und -ketone

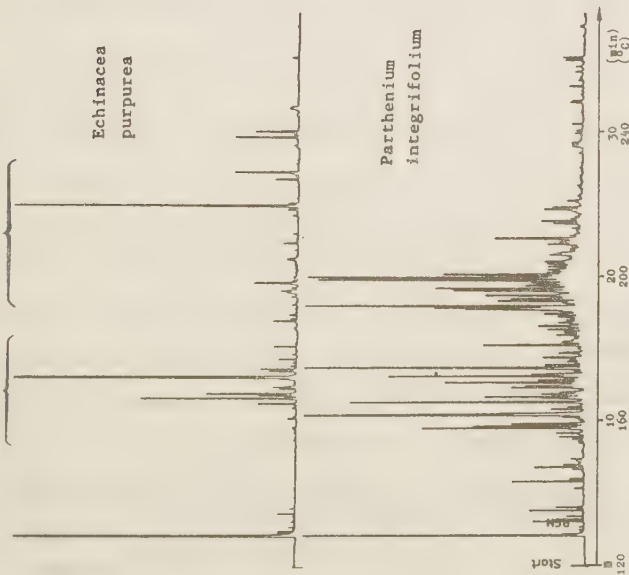
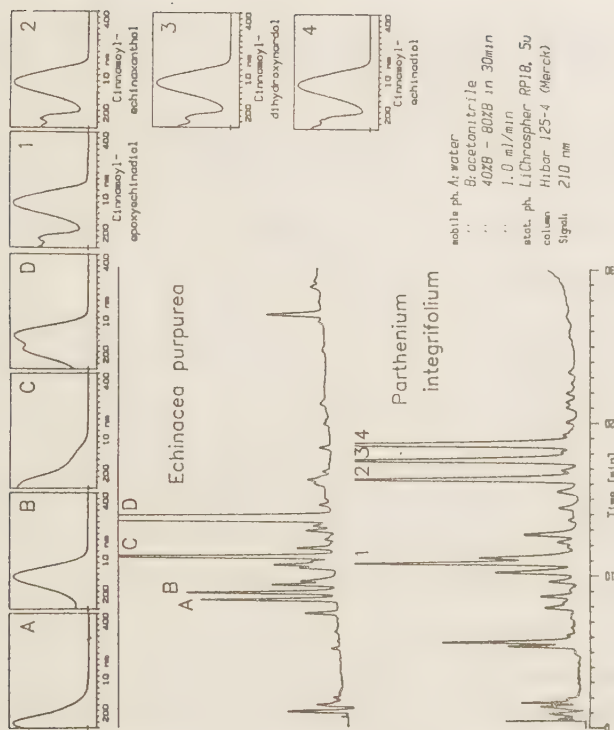


Abb. 68: GC-Vergleich der ätherischen Öle von *Echinacea purpurea* und *Parthenium integrifolium* Wurzeln



mobile ph. A: water
 .. 8: acetonitrile
 .. 40XB - 80XB in 30min
 .. 1.0 ml/min
 stat. ph. LiChrospher RP18, 5u
 column Hibor 125-4 (Merck)
 Sign. 210 nm

Abb. 67: HPLC-Fingerprint der Chloroformextrakte von *Echinacea purpurea* und *Parthenium integrifolium* Wurzeln

IX. Verwechslung von Echinacea angustifolia mit

Echinacea pallida

Bei morphologischen Untersuchungen von mehreren in Europa kultivierten Pflanzen von "Echinacea angustifolia" zeigte sich, daß es sich dabei in Wirklichkeit um Echinacea pallida handelt.

Beide Arten wurden 1968 von McGregor (1) unterschieden. Man kann sie an folgenden Merkmalen unterscheiden (Tab. 14) : Echinacea angustifolia ist kleinwüchsig, wird maximal 60 cm hoch und besitzt relativ kurze Zungenblüten. Echinacea pallida dagegen ist großwüchsig (120 cm) und hat bis zu 9 cm lange Zungenblüten (Abb. 64).

Echinacea angustifolia besitzt kleine, gelbe Pollen mit einem mittleren Durchmesser von 28 μm , während Echinacea pallida große weiße Pollen aufweist (30-40 μm). Echinacea angustifolia ist meist diploid, weist 22 Chromosomen auf, während Echinacea pallida tetraploid ist und 44 Chromosomen besitzt.

Auf eine Verwechslung der beiden Arten haben bereits Neugebauer (59) und Schindler (148) hingewiesen und dafür plädiert, beide gleichberechtigt in das HAB aufzunehmen, was allerdings bisher unterblieben ist. Aufgrund von teilweise falschen Abbildungen in Lehrbüchern und sicherlich auch wegen der großen Neigung der Echinacea-Pflanzen zur Bastardisierung, wurde in der Literatur die Auffassung vertreten, daß beide Pflanzen äquivalent sind. Verschiedene Autoren berichteten, daß chemisch keine Unterschiede bestünden, ohne allerdings immer die Authentizität ihres untersuchten Materials zu beweisen.

Tab. 14: Morphologische Unterschiede zwischen *Echinacea angustifolia* und *Echinacea pallida*

	<i>Echinacea angustifolia</i> DC var. <i>angustifolia</i>	<i>Echinacea pallida</i> (NUTT.) NUTT.
Wuchshöhe	30-60 cm	60-120 cm
Zungenblüten	2-4 cm lang abstehend	4-9 cm lang herabhängend
Röhrenblüten	6-8.5 mm lang	10-13 mm lang
Pollenfarbe φ	gelb 25-30 μm	weiß 30-40 μm
Chromosomen	diploid, n=11	tetraploid, n=22
Harzkanäle	im Mark	in Mark und Rinde
Mark	mit sklerotischen Zellen	ohne sklerotische Zellen

Aufgrund der Tatsache, daß die Wurzeln der beiden Arten morphologisch nicht zu unterscheiden sind (Abb. 65) (Bauer und Heubel, Publikation in Vorbereitung), und da *Echinacea angustifolia* vor der neuen Klassifizierung durch McGregor zeitweilig als Unterart von *Echinacea pallida* bezeichnet wurde (1), kann im nachhinein nicht mehr festgestellt werden, mit welcher Pflanze früher gearbeitet bzw. therapiert wurde.

Aufgrund unserer HPLC-Untersuchungen von zahlreichen authentischen *Echinacea pallida* Wurzeln und zweier authentischer Proben von *E. angustifolia* Wurzeln unterschiedlicher Herkunft (vgl. Abb 69) ergaben sich deutliche chemische Unterschiede. Die von uns isolierten Acetylenverbindungen kommen nur in *Echinacea pallida* vor. Entsprechend dieser Befunde sollte es sich bei der "Echinacea angustifolia" Handelsdroge überwiegend um *Echinacea pallida* handeln, was auch in früheren Arbeiten

bereits des öfteren vermutet wurde (3,145,146). Es ist deshalb erneut zu fordern, daß *Echinacea pallida* ebenfalls als Stammpflanze für das DAB 9 und HAB 1 zugelassen wird.

mobile ph. A: Wasser	stat. ph. LiChrospher RP18, 5µ
" B: Acetonitril	column Hibar 125-4
" 40% B - 80% B in 30min	Attn. (mAU) 100.0 (482.3)
" 1.0 ml/min	Zero: 5%
	Signal: 210 nm

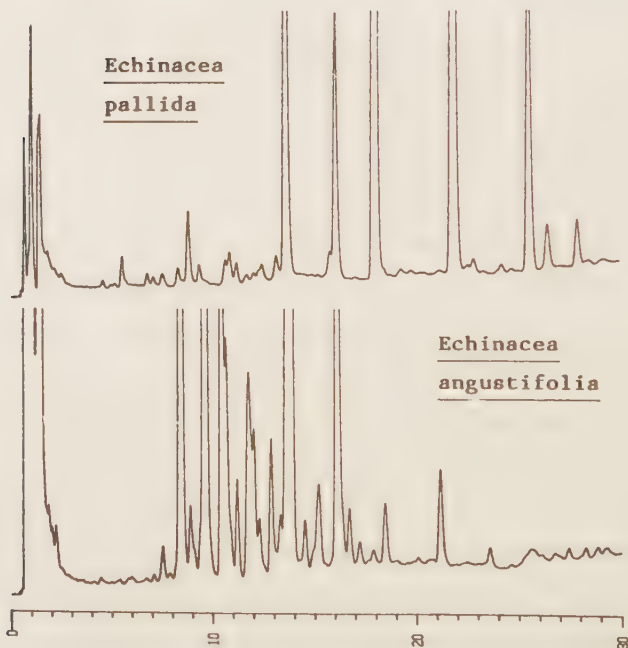


Abb. 69:

HPLC-Fingerprint der Chloroformextrakte von *Echinacea angustifolia* und *Echinacea pallida* Wurzel

Sesquiterpen-
kohlenwasserstoffe

Sesquiterpen-
alkohole und -ketone

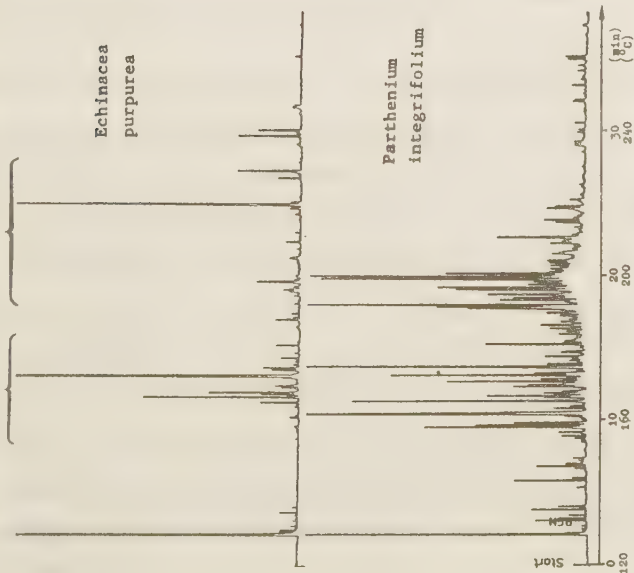
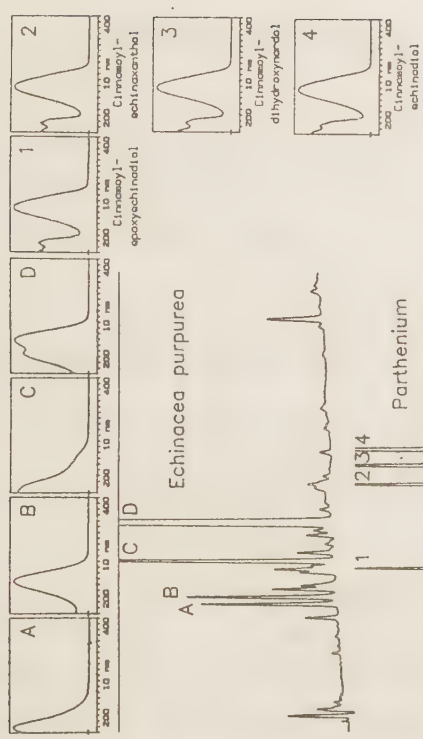


Abb. 68: GC-Vergleich der ätherischen Öle von Echinacea purpurea und Parthenium integrifolium Wurzeln



mobile phase: wasser
 .. Biotonitritile
 .. 40XB - 80XB in 30min
 .. 1.0 ml/min
 stat. ph. LiChrospher RP18, 5u
 column Hibar 125-4 (Merck)
 Signet 210 nm

Abb. 67: HPLC-Fingerprint der Chloroformextrakte von Echinacea purpurea und Parthenium integrifolium Wurzeln

IX. Verwechselung von Echinacea angustifolia mit
Echinacea pallida

Bei morphologischen Untersuchungen von mehreren in Europa kultivierten Pflanzen von "Echinacea angustifolia" zeigte sich, daß es sich dabei in Wirklichkeit um Echinacea pallida handelt.

Beide Arten wurden 1968 von McGregor (1) unterschieden. Man kann sie an folgenden Merkmalen unterscheiden (Tab. 14) : Echinacea angustifolia ist kleinwüchsig, wird maximal 60 cm hoch und besitzt relativ kurze Zungenblüten. Echinacea pallida dagegen ist großwüchsig (120 cm) und hat bis zu 9 cm lange Zungenblüten (Abb. 64).

Echinacea angustifolia besitzt kleine, gelbe Pollen mit einem mittleren Durchmesser von 28 μm , während Echinacea pallida große weiße Pollen aufweist (30-40 μm). Echinacea angustifolia ist meist diploid, weist 22 Chromosomen auf, während Echinacea pallida tetraploid ist und 44 Chromosomen besitzt.

Auf eine Verwechslung der beiden Arten haben bereits Neugebauer (59) und Schindler (148) hingewiesen und dafür plädiert, beide gleichberechtigt in das HAB aufzunehmen, was allerdings bisher unterblieben ist. Aufgrund von teilweise falschen Abbildungen in Lehrbüchern und sicherlich auch wegen der großen Neigung der Echinacea-Pflanzen zur Bastardisierung, wurde in der Literatur die Auffassung vertreten, daß beide Pflanzen äquivalent sind. Verschiedene Autoren berichteten, daß chemisch keine Unterschiede bestünden, ohne allerdings immer die Authentizität ihres untersuchten Materials zu beweisen.

D. Z U S A M M E N F A S S U N G

- Die Untersuchung zahlreicher Handelsdrogen von Echina-
ceae purpureae radix zeigte, daß die Importware aus USA
sehr häufig mit Wurzeln von Parthenium integrifolium
verfälscht wird.
- Aus den bisher phytochemisch nicht untersuchten Wurzeln
von Parthenium integrifolium wurden durch Kombination
verschiedener Methoden (Säulenchromatographie, präpara-
tive DC und HPLC) vier Sesquiterpenester isoliert und
mit Hilfe spektroskopischer Methoden bzw. Röntgen-
strukturanalyse in ihrer Struktur aufgeklärt:
Cinnamoyl-echinadiol, ein 7,8-Epoxy-9-hydroxy-10-iso
propyl-3,7-dimethyl-3-cyclodecen-1-yl cinnamat (Ester 1)
und Cinnamoyl-epoxyechinadiol, ein 4,5:8,9-Diepoxy-3-
hydroxy-2-isopropyl-5,9-dimethyl-cyclodecyl cinnamat
(Ester 2b). Bei beiden Verbindungen handelt es sich um
neue Germacranderivate, die mit Hilfe der Röntgen-
strukturanalyse aufgeklärt werden konnten.
Cinnamoyl-echinaxanthol, ein 5-Hydroxy-4-isopropyl-1-
methyl-7-(3-oxobutyl)-bicyclo-[4.1.0]-hept-3-yl cinnamat
(Ester 2a) und Cinnamoyl-dihydroxynardol ein 2,10-
Dihydroxy-3-isopropyl-10-methyl-6-methyliden-bicyclo-
[5.3.0]-dec-4-yl cinnamat (Ester 3), wurden mit Hilfe
von 2D-NMR Spektroskopie identifiziert. Es handelt sich
um ein Secoguajan- bzw. Pseudoguajan-Derivat.
- Immunologische Untersuchungen mit dem Carbon-Clearance-
Test und im Granulozyten-Test zeigten, daß die Sesqui-
terpenester eine immunstimulierende Wirkung besitzen.
Außerdem wirkt Ester 1 antiviral.

- Eine Analyse der Inhaltstoffe von Echinacea pallida Wurzeln, die irrtümlich unter der Bezeichnung "Echinacea angustifolia" im Handel sind, führte zur Isolierung von drei, bisher noch nicht bekannten Acetylen-Verbindungen. Ihre Strukturaufklärung erfolgte vorwiegend durch 2D-Protonen- und ^{13}C -Kernresonanz-Spektroskopie.

Substanz 1 wurde als das bisher nicht beschriebene 8-Hydroxy-tetradeca-9E-en-11,13-diin-2-on identifiziert. Die Strukturen von Substanz 2 und 2' wurden als 8-Hydroxy-pentadeca-9E-en-11,13-diin-2-on und 8-Hydroxy-pentadeca-9E,13Z-dien-11-in-2-on aus den ^1H -NMR, 2D-NMR, und ^{13}C -NMR Spektren abgeleitet.

Die Untersuchung von frischgeernteten Echinacea pallida-Wurzeln zeigte, daß die Acetylen-Verbindungen Artefakte darstellen müssen und erst bei der Lagerung entstehen.

Nach den ersten orientierenden Untersuchungen besitzt Echinacea angustifolia andere Inhaltsstoffe als Echinacea pallida, wodurch eine chemische Unterscheidung beider Drogen ermöglicht wird. Da in der Vergangenheit häufig Echinacea pallida anstelle von Echinacea angustifolia verwendet wurde, sollte in den Monographien der Arzneibücher Echinacea pallida als Stammpflanze ebenfalls zugelassen werden.

E. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Herkunft des Drogenmaterials

Parthenii integrifolii radix

Authentische Muster von *Parthenium integrifolium* Wurzeln wurden vom Herbar der Botanischen Staatssammlung München, sowie von Mr. Steven Foster, Ozark Benificial Plan Project, Brixey, Missouri, USA, zur Verfügung gestellt. Vorher wurden von verschiedenen deutschen Drogenhandlungen Wurzeln von "*Echinacea purpurea*" bezogen, die sich im nachhinein als *Parthenium integrifolium*-Droge herausstellten.

Echinaceae purpureae radix

Authentische Muster von *Echinaceae purpureae radix* wurden von den Firmen Spagyros SA, Boncourt, Schweiz; DHU, Karlsruhe; Madaus, Köln; Vogel und Weber, Inning; sowie vom Botanischen Garten, München und Herrn Bomme, Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau (LBP), Freising, zur Verfügung gestellt.

Authentische *Echinacea angustifolia* Wurzel erhielten wir von der Fa. Spagyros SA, Boncourt; Schweiz.

Echinacea pallida Wurzel stammte aus dem Botanischen Garten München, wo sie von Herrn Dr. G. Heubl als solche morphologisch identifiziert wurde, und von Herrn Bomme, LBP, Freising.

II Allgemeine Arbeitsmethoden

II.1 Dünnschichtchromatographie

II.1.1 Adsorbentien

Für die analytische DC:

Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten,

Schichtdicke 0.25 mm, Fa. Merck (Art. No. 5715)

Für die präparative DC:

Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten,

Schichtdicke 0,5 mm, Fa. Merck (Art. No. 5744)

Auftragetechnik:

analytisch: bandförmig mit ausgezogenen Kapillarröhrchen

präparativ: bandförmig mit an einer Schablone geführter Mikroliterpipette, deren Öffnung mit wenig Watte verschlossen wurde.

II.1.2 Laufmittelsysteme

a) Chloroform Extrakte

Toluol : Ethylacetat

19 : 4 (LM I)

7 : 3 (LM II)

6 : 5 (LM III)

93 : 7 (LM IV)

b) Zimtsäure

Toluol:Ethylformiat:Ameisensäure (50 : 40 : 10)

II.1.3 Detektion

Nach dem Trocknen wurden die Dünnschichtplatten unter dem UV-Licht bei den Wellenlänge 254 und 360 nm betrachtet. An Sprühreagenzien wurden verwendet:

Godin-Reagenz:

Es wird zunächst mit 10%-iger ethanolischer H_2SO_4 , dann mit 1%iger ethanolischer Vanillinlösung besprüht; anschließend wird die Platte im Trockenschrank ca. 2 min bei 120°C erhitzt.

Ehrlich Reagenz:

Es wird mit einer 1%-igen Lösung von 4-Dimethylaminobenzaldehyd in einer Mischung aus 25 ml Salzsäure (36%ig) und 75 ml Methanol besprüht. Die Platte wird bei 100°C erhitzt.

Antimon-III-chlorid (Carr-Price-Reagenz):

20 g Antimon-III-chlorid in 100 ml Chloroform. Nach Besprühen der Platte wird 3 min bei 100°C erhitzt.

Acetanhydrid/Schwefelsäure (Liebermann-Burchards Reagenz):

5ml H_2SO_4 conc. werden unter Kühlen gemischt; danach werden 50 ml absoluter Ethanol unter Kühlung zugefügt. Nach dem Besprühen wird kurz bei 100°C erhitzt.

EP-Reagenz nach Stahl (104):

0.25g 4-Dimethylaminobenzaldehyd werden in einer Mischung aus 45 ml Eisessig (Essigsäure 98%), 5 ml o-Phosphorsäure (85%) und 45 ml Wasser gelöst, und unter Kühlung mit 50 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Die Platte wird für 3 min bei 100°C erhitzt.

Natriumcarbonat/Kaliumpermanganat:

Mischung aus gleichen Volumina einer je 1%igen wäßrigen Kaliumpermagnat- und Natriumcarbonatlösung.

II.2 Säulenchromatographie

II.2.1 Adsorbens

Kieselgel Merck 60, Korngröße < 0.063 mm (feiner als 230 mesh ASTM), Art. No. 7729.

II.2.2 Elutionsmittel

Chloroform Extrakte: Toluol:Ethylacetat (19:4)

II.2.3 Pack- und Verfahrenstechnik

Das Kieselgel wurde mit dem jeweiligen Elutionsmittel auf einem Magnetrührer zu einer homogenen Suspension angerührt und in die schräggestellte Glassäule luftblasenfrei eingegossen. Nach Aufrichten der Säule wurde die Füllung mit einem Rundfilter und etwas Seesand abgedeckt. Es wurde solange mit dem Laufmittel gewaschen, bis die Füllhöhe konstant blieb. Der zu trennende Extrakt wurde in wenig Elutionsmittel gelöst und mit einer Pasteurpipette auf die Säule aufgetragen. Durch Aufsetzen einer zweiten, mit Elutionsmittel gefüllten Säule ließ sich der hydrostatische Druck erhöhen und damit die Trennung bei verkürzter Trennzeit verbessern. Zur Konstanthaltung des Pegels des Elutionsmittels in der Drucksäule diente ein oben angebrachter Scheidetrichter, der ein Laufmittelreservoir enthielt und an den ein leichter Unterdruck angelegt wurde. Nach Öffnen des Auslaufhahnes konnte so konstant das Elutionsmittel nachfließen. Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler in Fraktionen aufgefangen.

II.3 HPLC

II.3.1 | Apparative Daten

II.3.1.1 Semipräparative HPLC

Pumpe:	Perkin-Elmer Serie 3 B
Injektionssystem:	U 6 K (Waters Assoc.)
Detektor:	Schoeffel SF 770 Spektralphotometer
Schreiber:	Recorder 561 (Perkin-Elmer)

II.3.1.2 Analytische HPLC:

HP 1090 A Flüssigchromatograph, HP 1040A Photo-
diodenarray-Detektionssystem, HP 3392A Integrator,
HP 7470A Plotter (Hewlett Packard, Waldbronn)

Lösungsmittel

Als Fließmittel für die HPLC wurden ausschließlich
Lösungsmittel von ChromAR - Qualität der Fa. Promo-
chem, Wesel, verwendet.

Einspritzmenge

Reinsubstanz : 5-10 µl einer 0.02%igen Lösung
Extrakte : 50-100 µl einer 2%igen Lösung

II.3.2 Trennsysteme:

II.3.2.1 Analytische HPLC

Säule	: Hibar 125-4, LiChrospher 100CH-18/2, 5 µm (Merck)
Fließmittel	: A: Wasser, B: Acetonitril
Gradient	: von 40% B linear auf 80% B in 30 min
Durchfluß	: 1.0 ml/min
Detektion	: 280 nm für Sesquiterpenester 210 nm für Chloroform-Extrakte allg.
Einspritzmenge:	10 µl

II.3.2.2 Präparative HPLC

II.3.2.2.1 Isolierung der Sesquiterpenester

Säule : μ -Bondapak C18 (Waters Assoc.)
Laufmittel : 80 %iges Acetonitril/Wasser
Durchflußrate : 2 ml/min
Detektion : 220 nm

II.3.2.2.2 Isolierung der Acetylenverbindungen

Säule : μ -Bondapak C18 (Waters Assoc.)
Laufmittel : 40 %iges Acetonitril
Durchflußrate : 2 ml/min
Detektion : 210 nm

II.4 Physikalisch-chemische Untersuchungen

II.4.1 UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden direkt während der HPLC-Analyse mit dem Photodiodenarray Detektor aufgenommen.

II.4.2 IR-Spektren

Die öligen Substanzen wurden zwischen zwei Kaliumbromid-Preßlingen (ca. 2 mg Substanz mit einem Acculab-1 Spektrophotometer (Fa. Beckmann) vermessen.

II.4.3 Massen-Spektren

Die Messungen erfolgten mit den Massenspektrometern MS 30 und 402 S (Fa. AEI) sowie MS 80RFA (Fa. Kratos)

II.4.4 ^1H -NMR-Spektren

Die Routine-Spektren (80 MHz) wurden an unserem Institut mit einem Bruker WP-80 Kernresonanz-Spektrometer in CDCl_3 aufgenommen.

400 MHz-Spektren wurden an einem Bruker VM-400 NMR Spektrometer der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig aufgenommen.

II.4.5 ^{13}C -NMR-Spektren

Die ^{13}C -Spektren von Alkohol 1 und Ester 1 wurden an der Ungarischen Akademie der Wissenschaften auf einem Varian XL-100 Gerät bei 25.2 MHz, die anderen Verbindungen mit einem Bruker VM-400 Spektrometer der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig aufgenommen.

II.4.6 Zweidimensionale NMR-Spektren und NOE Spektren

Die H-H Korrelationsspektren für Alkohol 2a und 3 sowie die Acetylenverbindungen wurden mit einem Bruker VM-400 Spektrometer der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH Braunschweig aufgenommen..

II.4.7 Röntgenstrukturanalyse

Die Röntgenstrukturanalyse von Alkohol 1 und 2b erfolgte auf einem Nicolet R3m Diffraktometer.

Aufnahmeparameter: CuK -Strahlung ($\lambda = 0.71 \text{ \AA}$).

Die Berechnungen zur Strukturanalyse erfolgten für beide an der Rechenanlage Nova 3 (Data General).

III. Chemische Verfahren

III.1 Hydrolyse

Zur Gewinnung der Alkohole 1, 2a, 2b und 3 wurden die gereinigten Ester mit 0.5 N wäßriger Natronlauge versetzt und 3 h am Wasserbad erhitzt. Die Reaktionslösung wurde mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Alkohole befinden sich in der Chloroformphase.

III.2 Acetylierung

Alkohol 1, 2a, 2b und 3 wurden in 1 ml Essigsäureanhydrid/Pyridin (1:1) gelöst und 3 Std. unter Rückfluß gekocht. Die Reaktionslösung wurde mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroform-Phase wurde mit Wasser gewaschen bis kein Geruch nach Pyridin mehr wahrnehmbar war, und anschließend mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet.

IV. Spezielle Arbeitsmethoden

IV.1 Extraktion

IV.1.1 Parthenium integrifolium

500 g pulverisierte Wurzel von *Parthenium integrifolium* (nachträglich als *Parthenium integrifolium* identifizierte "*Echinacea purpurea*" Handelsdroge) wurden nacheinander mit Hexan, Chloroform, Ethylacetat und Methanol jeweils 24 Stunden in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert. Nach dem Einengen der Extrakte verblieben 23, 22, 18 bzw. 20 g ölige Rückstände.

IV.1.2 Echinacea pallida

1 kg pulverisierte *Echinacea angustifolia* Wurzeln des Handels, die später als *Echinacea pallida* identifiziert werden konnten, wurden mit Chloroform 24 Std. in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert. Nach Einengen der Extrakte unter vermindertem Druck verblieben 22 g eines öligen Rückstandes.

IV.2 Isolierung der Sesquiterpenester aus *Parthenium integrifolium*

Der Chloroformextrakt wurde auf eine Kieselgel-Säule mit einem Innendurchmesser von 4 cm und einer Länge von 45 cm aufgetragen. Als Elutionsmittel diente Toluol/Ethylacetat (19:4). Die Tropfgeschwindigkeit betrug 20 Tropfen/min.

Das Eluat wurde in Fraktionen zu ca. 10 ml (alle 30 min) aufgefangen. Die zusammengehörigen Fraktionen wurden durch DC-Kontrolle ermittelt, vereinigt und

im Vakuum eingeengt. Im einzelnen ergaben sich folgende Ausbeuten.

Fraktion 1 :	98	mg	angereicherter Ester 1
Fraktion 2 :	72	mg	angereicherter Ester 2
Fraktion 3 :	90	mg	angereicherter Ester 3

IV.2.1 Isolierung von Ester 1 durch präparative DC

Fraktion 1 der Säulenchromatographie, die Ester 1 in angereicherter Form enthielt wurde in Chloroform aufgenommen und wie beschrieben auf Kieselgelplatten zur präparativen DC aufgetragen (0.5 ml = 0.5 mg/Platte). Nach dem Entwickeln der Platten im Laufmittelsystem Toluol/Ethylacetat (7:3) wurde die vom Ester 1 hervorgerufene Fluoreszenzminderung im UV 254 nm mit Bleistift markiert. Die gekennzeichneten Flächen wurden ausgekratzt und das Kieselgel auf dem Magnetrührer 3 mal 20 min mit Chloroform extrahiert. Anschließend wurde dekantiert und durch eine Glasfritte C4 filtriert. Durch Membranfiltration (Sartorius Typ SM, Porengröße 0,45 µm) wurden letzte Reste von Kieselgel entfernt. Aus 98 mg Fraktion 1 erhielten wir dabei 40 mg Ester 1.

IV.2.2 Isolierung von Ester 2a und 2b

Fraktion 2 wurde ebenso wie Fraktion 1 durch präparative DC gereinigt. Die Reinheitsprüfung von Ester 2 mit HPLC auf einer C18 Umkehrphase (siehe 2.3.1) ergab, daß zwei Peaks bei 11 min (Ester 2b) und 16 min (Ester 2a) auftraten.

Die gereinigte Fraktion 2 wurde deshalb durch präparative HPLC mit 80%igem Acetonitril in die Reinstoffen Ester 2a und Ester 2b aufgetrennt. Pro Injektion konnten etwa 1.5 mg des in Acetonitril gelösten Gemisches 2a/b chromatographiert werden. Die Retentionszeiten betrugen ca. 16 min. (2b) und 23 min (2b).

Ausbeuten:	13 mg	Ester 2a
	15 mg	Ester 2b

IV.2.3 Isolierung von Ester 3

Die Ester 3 enthaltende Fraktion 3 der Säulenchromatographie wurde durch präparative DC gereinigt (s. 4.2.1), wobei wir 30 mg erhielten, die jedoch für spektroskopische Untersuchungen noch nicht geeignet war. Ester 3 wurde deshalb ebenfalls und durch präparative HPLC mit 80%igem Acetonitril reingestellt. Die Retentionszeit betrug 23 min.

Ausbeute: 20 mg Ester 3

IV.3 Kristallisationsversuche von Alkohol 1 und 2b

Für die Kristallisationsversuche wurde zunächst ein "Löslichkeitsprofil" erstellt: Die Alkohole waren leicht löslich in Chloroform, Dichlormethan, Ethylacetat, Hexan, schwerer löslich in Acetonitril, Ethanol und polaren Lösungsmitteln. Die Kristallisationsversuche wurden in kleinen Reagenzgläsern mit oben leicht aufgelegtem Korkstopfen und jeweils etwa 1 ml Substanz-Lösung (3 mg) durchgeführt. Zuerst wurde eine Kristallisation aus einzelnen

p.a. Lösungsmitteln versucht. Es konnten damit aber keine verwertbaren Kristalle erhalten werden. Deshalb wurde versucht, geeignete Lösungsmittelgemische zu finden. Aus folgenden Gemischen gelang keine Kristallisation: DCM/Toluol, Methanol/Hexan, Äther/Hexan, Chloroform/Hexan, Methanol/Chloroform. Aus Chloroform/Toluol 1:2 erhielten wir bei Raumtemperatur plättchenförmige Kristalle, die sich für die Röntgenstrukturanalyse eigneten.

V. Isolierung der Acetylenverbindungen aus Echinacea pallida

V.1 Anreicherung durch Säulenchromatographie

Der Chloroformextrakt von Echinaceae angustifoliae radix Handelsdroge, die später als Echinacea pallida identifiziert werden konnte, wurde auf eine Kieselgelsäule mit einem Innendurchmesser von 5 cm und einer Länge von 32 cm aufgetragen (s.II.2.3). Als Elutionsmittel diente Ethylacetat/Toluol (19:4). Die Tropfgeschwindigkeit betrug 15-20 Tropfen/min. Das Eluat wurde in Fraktionen von ca. 12 ml (alle 30 min) aufgefangen.

Ausbeuten: Fraktion	32-46	A	30 mg
Fraktion	47-54	B	30 mg
Fraktion	86-90	C	24 mg
Fraktion	113-118	D	60 mg
Fraktion	145-177	E	26 mg
Fraktion	291-400	F	200 mg

V.2 Isolierung von Verbindung F durch präparative DC

Die Verbindung F enthaltende Fraktion der Säulenchromatographie wurde in Chloroform aufgenommen und wie beschrieben auf Kieselgelplatten zur präparativen DC aufgetragen (0.5 ml = 0.5 mg/Platte). Nach dem Entwickeln der Platten im Laufmittelsystem Toluol/Ethylacetat (7:3) wurden die Zonen im UV 254 nm mit Bleistift markiert und ausgekratzt. Das Kieselgel wurde auf dem Magnetrührer 30 min mit Chloroform eluiert. Dabei erhielten wir 120 mg DC-reine Substanz F, die jedoch mit HPLC noch weiter in zwei Verbindungen aufgetrennt werden konnte.

Substanz F wurde deshalb durch präparative RP-HPLC mit 40%igem Acetonitril in die zwei Verbindungen mit der Retentionszeit 23 min (Substanz 1) und 27 min (Substanz 2) getrennt. Pro Injektion konnten etwa 2 mg des in Acetonitril gelösten Gemisches chromatographiert werden.

Ausbeuten:	Substanz 1	10 mg
	Substanz 2	30 mg

VI. Physikalische Daten

VI.1 Cinnamoyl-echinadiol (Ester 1)

$C_{24}H_{32}O_4$ (Ester) :	MG 384.22
$C_{15}H_{26}O_3$ (Alkohol) :	MG 254 Alkohol 1
Rf (DC) (Ester) :	0.32 (LM I)
UV (Ester) λ_{max} :	280 nm
IR (Ester) ν_{max} :	3450, 3060, 3020, 2940, 2860, (KBr) 1710, 1665, 1580, 1450, 1382, 1310, 1280, 1165, 1100 ¹ , 910, 820, 770, 730, 680 cm^{-1}
IR (Alkohol) ν_{max} :	3610, 3510, 3290, 3020, 1660, ($CHCl_3$) 1465, 1390, 1270, 1220, 1100, 1045, 930, 835, 730 cm^{-1}
MS (Ester) :	m/z (rel. Int. %) 384 [M] ⁺ (8), 327(3), 285(2), 257(2), 236(8), 218(4), 194(3.6), 169(4), 136(14), 131(100), 122(3), 115(2), 109(4), 103(3), 95(5), 93(5), 85(2), 83(5), 81(63), 62(2), 68(2), 57(2), 43(6), 40(2), 32(5).
MS (Alkohol) :	254 [M] ⁺ (2), 236 [$M-18$](15), 221 [$M-33$](8), 218 [$M-36(2 \times 18)$](17), 208(14), 197(10), 193(16), 190(11), 189(14), 175(19), 150(35), 149(28), 147(21), 135(32), 125(25), 123(41), 122(55), 115(61), 107(100), 95(94), 81(69), 73(107), 71(130), 69(87), 43(130), 41(130)
1H -NMR :	(siehe Tab. 7 S. 40)
^{13}C -NMR :	(siehe Tab. 8 S. 41)

VI.2 Cinnamoyl-echinaxanthol (Ester 2a)

$C_{24}H_{32}O_4$ (Ester 2a) :	MG 384.22
$C_{24}H_{26}O_3$ (Alkohol 2a):	MG 254
Rf (DC) (Ester 2a) :	2.8 (LM I)
UV (Ester 2a) λ_{max} :	275 nm
IR (Ester 2a) ν_{max} :	3590, 3060, 2910, 2860, 1710, (KBr) 1630, 1580, 1495, 1450, 1360, 1160 ¹ , 1010, 910, 860, 765, 730, 680 cm^{-1}

IR (Alkohol 2a) $\nu_{\max}$: 3360, 2910, 1710, 1360, 1200,
(KBr) 1160, 1040, 1015, 950, 910, 860,
780, 730 cm^{-1}

MS (Ester 2a) : m/z (rel. Int. %)
384 (M^+)(16), 366(4), 301(3),
327(49), 236(21), 218(20),
209(7), 194(28), 175(42),
160(40), 151(51), 131(80),
95(60), 81(52), 55(50), 43(100)

MS (Alkohol 2a): 254[M]⁺(3), 236 [M-18](14), 218
[M-36(2x18)](4), 193(13),
178(23), 175(22), 160(20),
149(38), 140(13), 122(85),
107(27), 95(80), 82(100),
71(17), 55(7), 43(38)

Tabelle 15: ¹H-NMR und ¹³C-NMR Daten von Echinaxanthol
(Alkohol 2a)

	¹³ C-NMR δ [ppm]	¹ H-NMR δ [ppm]	J[Hz]
CH(1)	28.8 (d)	0.23	J(1,2A) = 7.3
CH ₂ (2)	23.9 (t)	1.65(HA), 1.59(HB)	J(1,2B) = 7.3
CH ₂ (3)	43.8 (t)	2.51	J(1,5) = 5.5
CH(4)	208.8 (s)	-	J(2A,2B) = 14.4
CH(5)	35.1 (d)	0.83	J(2A,3) = 7.5
CH(6)	67.0 (d)	4.26	J(2B,3) = 7.5
CH(7)	45.3 (d)	0.48	J(5,6) = 1.7
CH(8)	67.0 (d)	4.02	J(6,7)=J(7,8)=1.3
CH ₂ (9)	43.3 (t)	2.01(HA), 1.70(HB)	J(7,11) = 10.4
C(10)	16.0 (s)	-	J(8,9A) = 2.4
CH(11)	24.6 (d)	2.09	J(8,9B) = 3.7
CH ₃ (12)	21.2 (q)	1.00	J(9A,9B) = -15.2
CH ₃ (13)	20.6 (q)	0.96	J(11,12) = 6.6
CH ₃ (14)	22.7 (q)	1.17	J(11,13) = 6.6
CH ₃ (15)	30.0 (q)	2.16	

VI.3 Cinnamoyl-epoxyechinadiol (Ester 2b)

C₂₄H₃₂O₅ (Ester 2b) : MG 400

R_f (DC) (Ester 2b) : 2.8 (LM I)

UV (Ester 2b) $\lambda_{\max}$: 280 nm

IR (Alkohol 2b) $\nu_{\max}$: 3280, 2960, 2920, 2880,
(KBr) 1450, 1390, 1240, 1100, 1045,
925, 830, 770, 670 cm^{-1}

MS (Ester 2b) : m/z (rel. Int. %) 400(1), 327(98),
284(28), 279(20), 236(30), 218(25),
193(29), 175(55), 149(70), 131(100),
121(30), 103(72), 95(58), 81(38),
69(32), 55(26), 43(68)

MS (Alkohol 2b) : 270 $[M]^+$ (1), 250(30), 252(20),
236(15), 209(40), 191(60),
169(70), 153(100), 109(60),
95(70), 71(75), 43(100), 41(40)

$^1\text{H-NMR}$ (Alkohol 2b): 4.37 (1H, m, H8), 3.80
 δ [ppm] (1H, dd, H5), 3.75 (1H, dd, H6),
3.22 (1H, t, H1), 2.60 (1H,
dd, H9a), 1.5 (1H, dd, H9b),
1.30, 1.40 (C4, C10, $-\text{CH}_3$ -Gruppe),
1.02 (Isopropylgruppe)

VI.4 Cinnamoyl-dihydroxynardol-(Ester 3)

$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_4$ (Ester 3) : 384.22

Rf (DC)(Ester 3) : 0.2 (LM I)

UV (Ester 3) λ_{max} : 280 nm

IR (Ester 3) ν_{max} : 3440, 3060, 2940, 1710, 1640,
(KBr) 1580, 1450, 1370, 1310, 1170,
1000, 890, 760, 710 cm^{-1}

IR (Alkohol 3) ν_{max} : 3380, 2920, 2840, 1640, 1460,
(KBr) 1430, 1280, 1150, 1020, 890, 790
 cm^{-1}

MS (Ester 3) : m/e (rel. Int. %)
384 (M $^+$)(5), 366(13), 341(12),
328(4), 298(15), 279(12),
256(10), 236(50), 218(30),
175(50), 151(45), 103(68),
91(17), 77(36), 55(22), 43(56)

MS (Alkohol 3) : 254 $[M]^+$, 236(18), 218(55),
203(52), 189(66), 175(67),
161(55), 147(65), 121(90),
107(100), 93(75), 73(95), 55(60),
43(100), 41(45)

VI.5 8-Hydroxy-tetradecendiinon (Substanz 1)

$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_2$: MG 218

Rf (DC) : 0,21 (LM I)

UV λ_{max} : 232, 250, 263, 281 nm

Tabelle 16: ^1H -NMR-und ^{13}C -NMR-Daten von Alkohol 3

^{13}C -NMR		^1H -NMR	
	δ [ppm]	δ [ppm]	J[Hz]
CH(1)	43.4(d)	2.31 a)	J(5,6)=8.9
CH ₂ (2)	28.5(t)	1.78-1.64	J(6,7)=3.8
CH ₂ (3)	40.2(t)	1.86(HA), 1.78-1.64(HB)	
C(4)	80.3(s)	---	J(7,8)=1.4
CH(5)	59.6(d)	2.31 a)	J(7,11)=9.7
CH(6)	71.7(d)	4.13	J(8,9A)=5.6
CH(7)	50.1(d)	1.10	J(8,9B)=7.4
CH(8)	71.3(d)	4.29	J(9A,9B)=-14.2
CH ₂ (9)	44.7(t)	2.64(HA), 2.60(HB)	J(9A,14)=1
C(10)	149.2(s)		J(9B,14)=0.7
CH(11)	26.5(d)	2.10	J(11,12)=6.6
CH ₂ (12)	21.5(q)	1.06	J(11,13)=6.6
CH ₂ (13)	21.6(q)	0.99	
CH ₂ (14)	111.1(t)	4.76(A), 4.75(HB)	
CH ₂ (15)	24.2(q)	1.25	

a) in C_6D_6 , CH(1) bei 2.07 und CH(5) bei 2.42 ppm;
J(1,5)=12.9 Hz und J(5,6)=9.4 Hz

Tabelle 17: ^1H -NMR-und ^{13}C -NMR-Daten von Substanz 1

^{13}C -NMR		^1H -NMR	
	δ [ppm]	δ [ppm]	J[Hz]
CH ₃ (1)	29.79 (q)	2.13	J(3,4)=7.3
C(2)	208.64 (s)	---	J(8,9)=5.6
CH ₂ (3)	43.60 (t)	2.431	J(9,10)= 15.9
CH ₂ (4)	23.72 (t)	1.563	J(10,8)=1.4
CH ₂ (5)	29.05 (t)	1.4-1.25	J(10,12)=1.2
CH ₂ (6)	24.97 (t)	1.4-1.25	
CH ₂ (7)	36.75 (t)	1.6-1.5	
CH(8)	71.79 (d)	4.203	
CH(9)	150.37 (d)	6.362	
CH(10)	108.06 (d)	5.742	
C(11)	{77.25 (s)}*	-----	
C(12)	{ (s)}*	-----	
C(13)	{77.66 (s)}*	-----	
CH(14)	70.98 (d)	2.419	

* Die Signale im Bereich 60-80 ppm waren sehr schwach

VI.6 8-Hydroxypentadecendiinon (Substanz 2)

$C_{15}H_{20}O_2$: MG 232

Rf (DC) : 0.21 (LM I)

UV λ max : 281, 263, 250, 236 nm

IR ν max: 3390, 2910, 2200, 1700, 1630,
(KBr) 1545, 1355, 1165, 1010, 950, 720 cm^{-1}

MS : m/z (rel. Int. %)
232 (M^+)(30), 189 [$M-CH_3CO$](12), 174
[189-Me]+(38), 161 (8), 147 (77), 133
(100), 119 (40), 95 (50), 43 (18)

Tabelle 18: 1H -NMR-und ^{13}C -NMR-Daten von Substanz 2

	^{13}C -NMR	1H -NMR	
	δ [ppm]	δ [ppm]	J[Hz]
CH_3 (1)	29.87 (q)	2.133	J(3,4)=7.3
C(2)	208.94 (s)	-----	J(8,7)=5.9
CH_2 (3)	43.61 (t)	2.423	J(8,9)=5.9
CH_2 (4)	23.69 (t)	1.6-1.5	J(9-10)=15.9
CH_2 (5)	29.02 (t)	1.5-1.3	J(10,15)=0.9
CH_2 (6)	24.99 (t)	1.5-1.3	J(10,8)=1.2
CH_2 (7)	36.73 (t)	1.6-1.5	
CH(8)	72.08 (d)	4.168	
CH(9)	148.53 (d)	6.253	
CH(10)	108.94 (d)	5.719	
C(11)	80.12 (s)	-----	
C(12)	75.17 (s)	-----	
C(13)	72.44 (s)	-----	
C(14)	64.38 (s)	-----	
CH_3 (15)	4.58 (q)	1.981	

VI.7 8-Hydroxypentadecadieninon (Substanz 2')

$C_{15}H_{22}O_2$: MG 234

Rf (DC) : 0,21 (LM I)

UV λ max : 260 nm

MS : m/z (rel. Int. %)
234 [M^+] (70), 219 [M-Me] (45), 193 (35), 176 (32), 159 (40), 149 (45), 135 (60), 121 (72), 95 (73), 83 (100), 71 (75), 55 (98)

1H -NMR : Die Signale für die Proton 1-8 waren
 δ [ppm] identisch mit denen von Substanz 2;
1.89 (3H, d, J15,14=6.8, H15), 5.59 (1H, ddd, J13,14=10.7, J13,10=1.8, H13), 5.86 (1H, ddd, J10,9=15.9, J10,8=1.6, H10), 5.99 (1H, dq, H14), 6.12 (1H, dd, H9)

^{13}C -NMR : C1 (q) 29.68 , C3 (t) 43.57 , C4 (t) 23.64 , C5 (t) 28.96 , C6 (t) 24.95, C7 (t) 36.78 , C8 (d) 72.25 , C9 (d) 144.86 , C10 (d) 110.24 , C11-13 lieferte kein Signal, C14 (d) 138.49 , C15 (q) 15.9 .

VII. Röntgenstrukturanalyse

VII.1 Echinadiol (Alkohol 1):

Raumgruppe : orthorhombisch $P 2_1 2_1 2_1$

Zellkonstanten : a = 8.413 Å
b = 10.962 Å
c = 16.492 Å

Dichte : berechnet = 1.12 g/cm³
gemessen = 1.14 g/cm³

Auf einem automatischen Einkristall-Diffraktometer (Nicolet R3m) wurden 1162 unabhängige Reflexe vermessen, davon 1081 $\geq 3\sigma$ (I) beobachtet. 2 Referenzreflexe, aufgenommen nach je 80 Messungen, zeigten keine Intensitätsänderungen. Die Rechnungen zur Strukturaufklärung erfolgten mit "Direkten Methoden" unter Verwendung des Programmsystems SHELXTL. Endgültiger R-Faktor nach Rücktransformation in

Tab. 19

	-X/A	Y/B	Z/C	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₂₃	U ₁₃	U ₁₂
C1	7362(12)	925(9)	3444(6)	717(71)	452(53)	629(61)	-59(52)	-60(58)	-201(58)
C2	7382(14)	-1073(9)	2517(6)	937(85)	617(63)	524(56)	-133(53)	-133(63)	-77(67)
C3	8730(15)	-267(11)	2125(5)	896(83)	791(81)	397(51)	-70(57)	-114(61)	-143(85)
C4	254(14)	-229(9)	2647(6)	788(74)	690(67)	460(57)	-98(53)	147(57)	-133(67)
C5	320(12)	802(8)	3250(5)	766(67)	400(48)	293(42)	-20(43)	126(47)	-161(55)
C6	1265(11)	706(8)	4022(5)	496(55)	414(48)	492(49)	-79(42)	-15(48)	-37(52)
C7	287(10)	73(8)	4720(5)	497(52)	420(49)	399(48)	58(45)	27(44)	86(50)
C8	8743(12)	796(8)	4987(5)	512(55)	510(52)	457(48)	-55(45)	-1(49)	67(53)
C9	7162(11)	156(10)	4768(6)	498(59)	799(70)	452(55)	-32(57)	88(49)	-148(60)
C10	6838(12)	723(9)	3856(6)	529(57)	643(65)	577(58)	50(54)	-44(50)	-280(63)
C11	1317(12)	-1895(9)	5477(5)	607(61)	691(64)	496(54)	68(51)	-95(52)	143(63)
C12	4065(14)	-1112(11)	6046(6)	889(83)	881(80)	541(59)	233(59)	-5(63)	73(77)
C13	2929(13)	-762(12)	5267(7)	496(63)	1128(96)	931(84)	298(81)	-31(67)	200(73)
C14	5965(13)	1165(10)	3468(6)	599(65)	692(68)	670(64)	41(57)	-111(58)	56(60)
C15	1196(16)	-1418(9)	2731(8)	912(87)	538(61)	1091(94)	-244(64)	57(45)	194(71)
O18	8770(8)	2038(5)	4665(4)	611(40)	387(32)	608(37)	-51(30)	18(38)	57(35)
O20	1253(4)	882(6)	2502(4)	831(50)	618(40)	555(36)	-64(35)	153(42)	-142(45)
O21	1774(7)	1929(5)	4257(4)	580(41)	419(34)	605(37)	-57(31)	-48(35)	-167(33)

P2₁: 9.17%

In Tabelle 19 befinden sich die Atom-Koordinaten der Nicht-Wasserstoffatome von Echinadiol ($\times 10^4$) (s. S. 134). Die Lage-Parameter sind als Bruchteile der Elementarzellen-Konstanten angegeben.

Die Temperatur-Faktoren (U_{IJ}) sind definiert nach $\exp -2^2 (U_{11}h^2a^{+2} + \dots + 2U_{12}hka^+b^+)$

VII.2 Epoxyechinadiol (Alkohol 2b)

Raumgruppe : orthorhombisch P 2₁ 2₁ 2₁

Zellkonstanten : a= 8.269 Å
b= 10.698 Å
c= 16.700 Å

Dichte : berechnet = 1.11 g/cm³
gemessen = 1.10 g/cm³

Auf einem automatischen Einkristall-Diffraktometer (Nicolet R3m) wurden 1159 unabhängige Reflexe vermessen, davon 1091 $\geq 4 \sigma$ (I) beobachtet. 2 Referenzreflexe, aufgenommen nach je 80 Messungen, zeigten keine Intensitätsänderungen.

Die Rechnung zur Strukturaufklärung erfolgte mit "Direkten Methoden" unter Verwendung des Programmsystems SHELXTL.

Endgültiger R-Faktor : 9.35 %

In Tabelle 20 sind die Atom-Koordinaten der Nicht-Wasserstoffatome von Epoxyechinadiol ($\times 10^4$) (s.S 136) wiedergegeben.

Die Lage-Parameter sind als Bruchteile der Elementarzellen-Konstanten angegeben. Die Temperatur-Faktoren (U_{IJ}) sind definiert nach $\exp -2^2 (U_{11}h^2a^{+2} + \dots + 2U_{12}hka^+b^+)$ (Standardabweichungen im selben Maßstab in Klammern).

Tab. 20

	-X/A	Y/B	Z/C	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₂₃	U ₁₃	U ₁₂
C1	7764(14)	-1043(9)	3496(6)	568(69)	354(60)	489(59)	-27(52)	-38(58)	123(56)
C2	7598(15)	-1207(10)	2572(6)	760(85)	528(72)	444(61)	-218(60)	35(65)	121(67)
C3	6216(16)	-423(11)	2214(6)	541(71)	757(81)	390(58)	-189(58)	28(60)	82(72)
C4	4712(14)	-3940(11)	2737(6)	499(69)	660(76)	338(58)	-161(56)	-147(54)	67(65)
C5	4653(13)	707(9)	3305(5)	495(62)	332(52)	225(45)	-20(42)	-100(47)	140(53)
C6	3700(13)	642(9)	4086(5)	349(54)	378(56)	394(53)	-149(46)	-29(51)	9(55)
C7	4730(11)	100(8)	4774(5)	322(52)	371(55)	244(46)	36(43)	-3(43)	-10(51)
C8	6267(13)	898(9)	4979(5)	408(56)	379(53)	312(47)	-95(44)	-55(50)	-5(57)
C9	7896(13)	278(10)	4789(6)	388(59)	538(67)	370(54)	9(52)	-108(51)	93(57)
C10	8361(12)	91(10)	3914(6)	338(60)	479(63)	518(62)	-60(54)	-79(51)	137(55)
C11	3720(14)	-114(10)	5548(6)	473(63)	688(76)	367(55)	49(55)	80(57)	-116(71)
C12	2082(15)	-732(15)	5387(7)	424(69)	1315(128)	701(82)	297(93)	15(70)	-250(80)
C13	4723(16)	-951(12)	6128(6)	707(82)	805(87)	428(61)	280(66)	-75(64)	-173(83)
C14	9095(14)	1208(10)	3468(7)	490(74)	508(66)	607(69)	61(59)	54(63)	10(61)
C15	3824(17)	-1566(10)	2858(8)	685(84)	502(70)	789(84)	-223(64)	101(79)	-146(74)
O18	6168(8)	2087(5)	4624(4)	409(37)	254(33)	487(37)	-36(30)	-44(36)	-54(44)
O20	3695(10)	697(7)	2572(4)	623(47)	606(46)	356(36)	-00(36)	-149(40)	204(47)
O21	3111(8)	1859(6)	4263(4)	411(39)	304(36)	474(38)	-10(32)	17(35)	150(34)
O22	9385(9)	-1038(7)	3807(5)	428(45)	574(51)	735(54)	-97(45)	-62(42)	203(41)

VIII. Pharmakologoligische Untersuchungen

VIII.1 Carbon-Clearance-Test (141):

Kohle-Suspension: 16 mg/ml Kohle in physiologischer Kochsalzlösung mit 1% Gelatine suspendiert.

Mäuse : 30 bis 35 g, männlich

Den Mäusen wurde die Testsubstanz in einer Konzentration von 10 mg/kg Körpergewicht intravenös eingespritzt. Derselben Anzahl von Mäusen wurde zur Kontrolle dasselbe Volumen einer Lösung von 1% Arlatone 285 (Fa. Atlas Chemie) in isotonischer Kochsalzlösung gespritzt.

Nach 24 Stunden wurde den Mäusen 0.2 ml/20 g der auf 37°C vorgewärmten Kohlesuspension gespritzt. 3, 6, 9, 12 und 15 min nach der Injektion wurden jeder Maus mit einer Mikropipette 15 µl Blut aus dem retroorbitalen Venen-Plexus entnommen. Das entnommene Blut wurde in 2.0 ml Aqua dest. hämolyisiert und die Extinktion der Kohlesuspension photometrisch bei 650 nm bestimmt.

Berechnung der Carbon-Clearance

Zwischen den Zeiten der Blutentnahme und dem log der Extinktionen der Kohle/Blutsuspensionen besteht ein linearer Zusammenhang : $\log E = RC_{tr} t + b$. Die Steigung der Geraden wird als Regressionskoeffizient RC_{tr} aus den Meßpunkten ermittelt. Aus dem Verhältnis des Regressionskoeffizienten der Testsubstanz RC_{tr} und dem Regressionskoeffizient der Kontrolle RC_C wird die Phagozytoseaktivität bestimmt und nach deren Verhältnis die DSK-Note vergeben.

RC_{tr}/RC_c < 1.0 Suppression
 < 1.5 DSK-Note 1
 > 1.5 DSK-Note 2

Tabelle 21: Einfluß von Ester 1 auf die Carbon-Clearance bei Mäusen

Kontrolle:		<u>Extinktionen</u>				<u>Steigung</u>
	3'	6'	9'	12'	15'	
Maus	-----					
1	0.497	0.478	0.375	0.237	0.219	-0.03388
2	0.478	0.402	-----	0.316	0.259	-0.02122
3	0.513	0.485	0.348	0.204	0.210	-0.03840
4	0.532	0.389	0.307	0.172	0.134	-0.0517

Mittelw.	0.505	0.439	0.343	0.232	0.206	-0.0352

Ester 1:

Maus	-----					
1	0.453	0.262	0.121	0.040	0.059	-0.0745
2	0.302	0.192	0.145	0.043	0.051	-0.0592
3	0.421	0.263	0.141	0.066	0.062	-0.0755
4	0.505	0.314	0.143	----	0.067	-0.0745
5	0.584	0.456	----	0.231	0.076	-0.0689
6	0.533	0.475	0.195	----	0.081	-0.0723

Mittelw.	0.466	0.327	0.149	0.169	0.066	-0.066

Für Ester 1 (Cinnamoyl-echinadiol) konnten wir auf diese Weise ein Verhältnis RCT_r/RC von 1.88 ermitteln, was einer DSK-Note von 2 entspricht.

VIII.2 Granulozyten-Test (mod. nach BRANDT) (140)

Granulozytensuspension

15 ml heparinisiertes Venenblut klinisch gesunder Erwachsener wurde mit 1.5 % Dextran T 500 (Pharmacia) 2:1 verdünnt. Nach 30 Min. wurde der Überstand 7 min bei 500 U/min zentrifugiert. Die Granulozyten im Bodensatz wurden zweimal mit je 5 ml RPMI-Puffer nachgewaschen. Darauf wurden die Granulozyten in ca. 5 ml Puffer suspendiert und auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Hefesuspension

Bäckerhefe wurde in isotonischer NaCl-Lösung suspendiert, auf 100°C erhitzt, dreimal durch Gaze filtriert und auf $3-5 \times 10^7$ Partikel/ml eingestellt.

Poolserum

Eine Mischung des Serums von 5 klinisch gesunden Erwachsenen wurde in Portionen zu 5 ml eingefroren und zum Test mit isotonischer NaCl-Lösung 1:10 verdünnt.

Durchführung des Tests

Je 0.2 ml Poolserum, Granulozytensuspension und Hefesuspension wurden mit 0.2 ml Testlösung (bzw. 0.2 ml isotonischer NaCl-Lösung mit 0.1% Arlatone zur Kontrolle) versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. 0.5 ml des Ansatzes wurden auf einen Objektträger gebracht und 35 min bei Raumtemperatur sedimentiert. Der Überstand wurde mit isotonischer

NaCl-Lösung abgespült und die Objektträger mit einem Fön getrocknet. Die Anfärbung des Präparates erfolgte nach der Pappenheim-Methode.

Berechnung des Phagozytose-Index:

Der Phagozytose-Index errechnet sich aus der Summe der mikroskopisch gezählten, in einer bestimmten Anzahl von Granulozyten inkorporierten Hefezellen, dividiert durch die Anzahl der Granulozyten.

Tabelle 22: Prozentuelle Steigerung der Phagozytose im Granulozytentest nach BRANDT

Substanz	Phagozytosewerte in Prozent bei Konz.[mg/ml]					
	10^{-1} *	10^{-2} *	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Ester 1	-9.4%	+7.3%	+24.7%	+15.9%	-3.0%	+1.7%
Ester 2	-5.8%	+6.3%	+15.9%	+18.6%	+1.7%	
Ester 3	-4.3%	+18.3	+22.3%	+6.8%	-3.4%	

* Meßwerte im Aktivitätsbereich der Kontrolle (0.1% Arlatone)

Prozentangaben bezogen auf die Kontrolle

VIII.3 Virus-hemmende Wirkung:

Ein geschlossener HeLa-Zellrasen in Petrischalen wurde mit einer Virussuspension so dicht beimpft, daß dichtstehende, jedoch einzelne Plaques entstehen. Nach einer Bindungszeit von 1 Stunde wird eine Agarschicht darübergegossen, um eine unkontrollierte Ausbreitung der Virusinfektion zu verhindern. Auf diese Agarschicht wird ein Filterpapierblätt-

chen gelegt ($\varnothing$ 10 mm), das 0.02 ml des zu prüfenden Pflanzenextraktes enthält. Aus diesem Blättchen diffundieren die Extraktsubstanzen in den Agar hinein und hemmen evtl. die Virusvermehrung. Die Zellkulturen werden je nach Virusart 48-72 St. lang bei 37°C bebrütet. Anschließend erfolgt eine Anfärbung der durch das Virus nicht zerstörten HeLa-Zellen mit dem Vitalfarbstoff Tetrazoliumchlorid. Wenn ein Extrakt virustatisch wirkt, dann bildet sich um das Blättchen eine plaquefreie gefärbte Zone der noch lebenden Zellen, während der übrige Bereich die Plaques und damit die Zellzerstörung durch das Virus anzeigt. Oft findet sich direkt um das Blättchen eine ungefärbte "toxische Zone", an die sich erst die "virustatische Zone" anschließt. Dieser als "toxische Zone" bezeichnete Bereich zeigt an, daß der getestete Extrakt daneben auch zytotoxisch wirkt. Zur Beurteilung werden der zytotoxische bzw. virustatische Hemmhof in mm ausgemessen. Als Testvirus diente das Herpesvirus Hominis.

- 1) MCGREGOR, R.L.: The taxonomy of the genus Echinacea, The Univ. of Kansas Science Bulletin 48, 113-42, (1968).
- 2) HEEGER, E.F.: Handbuch des Arznei- und Gewürzpflanzenanbaues, Drogengewinnung. Deutscher Bauernverlag, Berlin, (1956).
- 3) DECANDOLLE, A.P. und A. DECANDOLLE. 1824-73, 17 Prodromus Systematis Regni Vegetabilis.
- 4) CRONQUIST, A.: "Notes on the Compositae of the North-Eastern United states, 11, Heliantheae and Helenieae". Rhodora 47 : 396-403 (1945).
- 5) MCGREGOR, R.L.: " A New species and two New varieties of Echinacea (Compositae)". Trans. Kans. Acad. Sci. 70 : 366-70 (1968).
- 6) GATHERCOAL, E.N. und E.H. WIRTH: Pharmacognosy, Lea & Febiger Verlag USA (1949).
- 7) MORRISON, R.: Plantarum Historiae Universalis. Pt. 3, Sec. 6, Pl. 9 (1699).
- 8) PLUNKENETT, L.: "Opera Omnia Botanica IV" Almagestrum Botanicum. London. 402 (1696).
- 9) FOSTER S.: Echinacea Exalted, Ozark Beneficial Plant project HCR Box 3, Brixey, Missouri (1985).
- 10) NECKER, N.J.de: Elementa Botanica 1, 7 (1790).
- 11) MOENCH, C.: Methodas Planatas. 780 pp (1794).
- 12) ALBUS, G. und H. HERING: Med. Klinik 37, 276 (1941).
- 13) GIESBERT: Fortschr. Ther. 19, Heft 4 (1943), zit. nach Schindler, H., Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 3, 485 (1953).
- 14) BÜSING, K.H.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 2 467 (1952).
- 15) KING, J.: The American Electric Dispensatory. Cincinnati (1852).
- 16) CLAPP, A.: "A Report on Medical Botany" Transactions of the A.M.A. 5, 698-906 (1852).
- 17) LLOYD, J.U.: "A Treatise on Echinacea". Drug Treatise no. 30 Cincinnati. Lloyd Brothers, Pharmacists, Inc. (1921).
- 18) MEYER, H.C.F., zitiert nach Echinacea Exalted S. 14 (siehe (9)).
- 19) MEYER, H.C.F., zitiert nach Echinacea Exalted S. 15 (siehe (9)).
- 20) KING, J.: Eclectic Medical Journal S. 316 (1887).
- 21) LLOYD, J.U.: Treatise on Echinacea, S. 12 (1924).
- 22) SCHOEPP, J.D.: "Materia medica americana potissimum regni Vegetabilis" S. 127, Erlangen (1797), zit. nach Schindler H. (148).
- 23) DIERBACH, H.: "Abhandlung über die Arzneikräfte der Pflanzen" S. 200, Lemgo (1831), zit. nach Schindler, (148).
- 24) HESSEN, W. und C. SCHROEDER: Med. Monatsschrift 14(4), 251 (1960).
- 25) HESSEN, W.: Erfahrungsheilkunde 13(5), 33 (1964).
- 26) KLEIN, K.: Medizinische 16, 43 (1953).

- 27) MÜNNICH, A.: Münch. Med. Wschr. 98, 579 (1956).
- 28) KLEES, E.: Dtsch. Med. Journal 7, 697 (1956).
- 29) MOELL, O.H.: Der Krankenhausarzt 24, 299 (1951).
- 30) RÖSELER, W.: Der Krankenhausarzt 23, 38 (1950).
- 31) SCHUSTER, A.: Med. Monatsschrift 6, 453 (1952).
- 32) BAETGEN, D.: Med. Monatsschrift 18, 129 (1964).
- 33) ZIMMERMANN, O.: Hippokrates 40, 233 (1969).
- 34) FELDER, H.: Med. Klinik 54, 525 (1959).
- 35) BAUER, K.M.: Medizinische 50, 1863 (1957).
- 36) HERMANN, G.: Münch. Med. Wschr. 94, 385 (1952).
- 37) TRONNIER, H.: Münch. Med. Wschr. 109, 2118 (1967).
- 38) MEISSNER, F.: Dissertation Uni. München (1980).
- 39) KORTING, G.W. und K. RASP: Medizinische 45, 1504 (1954).
- 40) BREHM, G.: Ärztl. Sammelblätter 51, 423 (1962).
- 41) FRANKEN, E. und N. SÖNNICHSEN: Aesthetische Med. 15, 242 (1966).
- 42) SCHNURBUSCH, F.: Z. Laryng. Rhinol. Otol. 34, 520 (1955).
- 43) HEYL, F.W. und J.F. STALEY: Am. J. Pharm. 86, 450 (1914).
- 44) HEYL, F.W. und M.C. HART: J.Am.chem.Soc. 37 1769 (1915).
- 45) VERELIS, C.D.: Dissertation Heidelberg (1978).
- 46) BECKER, H.: Dtsch. Apoth. Ztg. 122, 2320 (1982).
- 47) VERELIS, C. und H. BECKER: Planta med. 31, 288 (1977).
- 48) JACOBSON, M.: J. Org. Chem. 32, 1646 (1967).
- 49) BOHLMANN, F. und M. GRENZ: Chem. Ber. 99, 3197 (1966).
- 50) SCHULTE, K.E., G. RÜCKER und J. PERLICK: Arzneim.-Forsch. (Drug Research) 17, 825 (1967).
- 51) JACOBSON, M.R., R.E. REDFERN und G.D. MILLS: Lloydia 38, 473 (1975).
- 52) STOLL, A., J. RENZ und A. BRACK: Helv. Chim. Acta 3, 1877 (1950).
- 53) BECKER, H., W.C. HSIEH, R. WYLDE, C. LAFFITE und C. ANDARY: Z. Naturforsch. 37c, 351 (1982).
- 54) HSIEH, WEI-CHUNG: Dissertation Heidelberg (1984).
- 55) MALONGA-MAKOSI, J.P.: Dissertation, Heidelberg (1983).
- 56) RÖDER, E., H. WIEDENFELD, TH. HILLE und R. BRITZKIRTGEN: Dtsch. Apoth. Ztg. 124, 2316 (1984).
- 57) WAGNER, H. und A. PROKSCH: Z. angew. Phytother. 2, 166 (1981).
- 58) WAGNER, H., A. PROKSCH, I. RIESS-MAURER, A. VOLLMAR, S. ODENTHAL, H. STUPPNER, K. JURCIC, M. LE TURDU und J.N. FANG: Arzneim.-Forsch. (Drug Res) 35, 1069 (1985).
- 59) Neugebauer, H.: Pharmazie 4, 137 (1949).
- 60) GÜNTHER, E., E.F. HEEGER und C. ROSENTHAL: Pharmazie 7, 24 (1952).
- 61) UFER, R.: Dissertation, Köln (1939).
- 62) KOCH, F.E.: Hippokrates 11, 373 (1940).
- 63) NEW BRITTEN & BROWN, Illustrated Flora of the North-Eastern United States and Adjacent Canada by H.A. GLEASON, 3, 348-51, The New York Botanical Garden (1952).

- 64) PROKSCH, A.: Dissertation, München (1982).
- 65) New Britton and Brown , Illustrated Flora of the North-Eastern United States and Adjacent Canada by H.A. GLEASON, 3, S. 371 (1952).
- 66) KOCH, F.E. und H. HAASE: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 2, 464 (1952).
- 67) KOCH, F.E. und H. UEBEL: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 3, 16 (1953).
- 68) KORTING ,W. und W. BORN: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 4, 424 (1954).
- 69) KOCH, F.E. und H. UEBEL: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 4, 551 (1954).
- 70) KUHN, O.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 3, 194 (1953).
- 71) TUNNERHOFF, K. und H.K. SCHWABE: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 12, 1171 (1962).
- 72) VOGEL, G., M.L. MAREK und R. OERTNER: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 18, 426 (1968).
- 73) TONUTTI, E.: Zschr. mikrosk. anat. Forsch. 51, 346 (1942).
- 74) TONUTTI, E.: Zschr. exper. Med. 114, 336 (1945).
- 75) TONUTTI, E.: Verh. deutsch. Ges. inn. Med. 62, 177 (1956).
- 76) LÜTZENKIRCHEN, A.: Medizinische 27/28, 926 (1952).
- 77) MOSTBECK, A. und M. STUDLER: Wiener Med. Wschr. 112, 259 (1962).
- 78) CHONE, B.: Arzt. Fortsch. 19, 611 (1965).
- 79) CHONE, B. und G. MONADAKIS: Dtsch. Med. Wschr. 94(27), 1406 (1969).
- 80) BITTNER, E.: Dissertation Univ. Freiburg (1979).
- 81) ORZECZOWSKI, G.: Ärztl. Fortbildung 52, 22 (1963).
- 82) ORZECZOWSKI, G.: Med. Welt 6, 293 (1963).
- 83) BONADEO, I., G. BOTAZZI und M. LAVAZZA: Riv. Ital. Essenze-Profumi-Piante officin.-Aromi-Saponi-Cosmetici-Aerosol 53, 281 (1971).
- 84) ORINDA, D., J. DIEDERICH und A. WACKER: Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 23, 1119 (1973).
- 85) WACKER, A. und W. HILBIG: Planta med. 33(1), 89 (1978).
- 86) NIKOLSKOYA, B.S.: Farmakologov, Akad. Nauk S.S.S.R. 2, 194-7 (1954) zit. nach C.A. 49: 8490i (19..).
- 87) STOLL, A., J. RENZ und A. BRACK: Helv. Chim. Acta 33, 1877-93 (1950).
- 88) VOADEN, D.J., J. MARTIN: J.Med. Chem. 15, 619-23 (1972).
- 89) MARTIN, J.: J. Org. Chem. 32(5), 1646-47 (1967).
- 90) MARTIN, J.: Lloydia 38(6), 473-6 (1975).
- 91) FOSTER S. Echinacea Exalted, S. 11, (siehe Lit. (9)).
- 92) BURNETT W.C., S.B. JONES, T.J. MABRY und W. PADOLINA: Biochem. System. Ecol. 9, 25 (1974).
- 93) RODRIGUEZ, E., G.H.N. TOWERS und J.C MITCHELL: Phytochemistry 15, 1973 (1976).
- 94) HARTWELL, J.L. und B.J. ABBOTT: Advanc. Pharmacol. Chemother. 7, 117 (1969).
- 95) RODRIGUEZ, E.: Contact Dermatitis 3, 155-162, (1977).

- 96) HERZ, W. und P.S. SUBRAMANIAM: *Phytochemistry* 10, 1689-90 (1971).
- 97) ROMO, J., A. ROMO de VIVAR, A. ORTEGO und A. DIAZ: *Rev. Latinoamer. Quim.*, 1(3), 132-5 (1970).
- 98) ROMO de VIVAR A., M. AGUILAR, H. YOSHIOKA, A. HIGO, E. RODRIGUEZ, J.A. MEARS und T.J. MABRY: *Tetrahedron* 26 (11), 2775-80 (1970).
- 99) RODRIGUEZ, E., H. YOSHIOKA und T.J. MABRY: *J. Org. Chem.*, *Rev. Latinoamer. Quim.* 2(4), 184-7 (1972).
- 100) YOSHIOKA, H., E. RODRIGUEZ und T.J. MABRY: *J. Org. Chem.* 35(9), 2888-91 (1970).
- 101) RUESCH, H. und T.J. MABRY: *Tetrahedron* 25(4), 805-11 (1969).
- 102) RODRIGUEZ, E., M.O. DILLON, T.J. MABRY, J.C. MITCHELL und G.H.N. TOWERS: *Experientia* 32(2), 236-8 (1976).
- 103) WAGNER, H., S. BLADT und E.M. Zgainski: *Drogenanalyse*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1983).
- 104) STAHL, E.: *Dünnschichtchromatographie*, 2. Ausgabe, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1967).
- 105) STAHL, E.: *Dtsch. Apoth. Ztg.* 93, 197 (1953).
- 106) HESSE, M., H. MEIER und B. ZEEH: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1979).
- 107) PRETSCH, C. und S. SEIBEL: *Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1976).
- 108) STILLMANN, M.J. und J.B. STOTHERS: *Can. J. Chem.* 59(15), 2303-5 (1981).
- 109) HOLUB, M., Z. SAMEK, V. HEROUT und F. SORM: *Coll. Czechslov. Chem. Comm* 32, 591 (1967).
- 110) BOHLMANN, F. und J. ZIESCHE: *Phytochemistry*. 18, 1489-93 (1979).
- 111) NIWA, M., M. IGUCHI, S. YAMAMURA: *Tetrahedron Lett.* 42, 3661-64, (1975).
- 112) NIKOLAUS, H.F.: *Rev. Latinoamer. Quim.* 9, 41-46 (1978).
- 113) BANERJEE, S., M. GRENZ, J. JAKUPOVIC und F. BOHLMANN: *Planta med.* 177-79 (1985).
- 114) POTAPOV, B.M.: *C.A* 95, 21286 (1981).
- 115) MABRY, T.J. und H. YOSHIOKA: *Tetrahedron Lett.* 25, 4767-79 (1969).
- 116) BOHLMANN, F., J. ZIESCHE, H. ROBINSON und M.R. KING: *Phytochemistry* 20, 267-70 (1981).
- 117) HIKINO, H., C. KONNO und T. TAKEMOTO: *Chem. Comm.* 662-63 (1969).
- 118) TORRANCE, S.J., T.A. GEISSMANN und M.R. CHEDEKEL: *Phytochemistry* 8, 2381-92 (1969).
- 119) BOHLMANN, F., K. KNOLL, C. ZDERO, P.K. MAHANTA, M. GRENZ, A. SUWITA, D. EHLERS, N.L. VAN, W.R. ABRAHAM und A.A. NATU: *Phytochemistry* 16, 965-85 (1977).
- 120) SHELDRICK, G.M.: *SHELXT* (Release 2.5), A Programm for Crystal Structure Determination, Cambridge Göttingen (1980).

- 121) HERZ, W.A., R.P. SHARMA: J. Org, Chem. 41, 1015 (1976).
- 122) WADA, K., Y. ENOMOTO, K. MATSUI und K. MUNAKOTA: Tetrahedron. Lett. 4673-76 (1968).
- 123) KIRYALOV, N.P.: Abstracts of Lectures at the third Indo-Soviet Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, Tashkant (1973).
- 124) GOVOLINA, L.A., A.I. SAIDKHODZHAEV und V.M. MALIKOV: Chem. Nat. Comp. 606 (1979).
- 125) SAIDKHODZHAEV, A.I. und V.M. MALIKOV: J. Chem. Nat. Comp. 721-24 (1978).
- 126) KAMILOV K.M., V.M. PATAPOV und G.K. NIKONOV: Khim. priir. Soedin. 132 (1976).
- 127) SAGITDINOVA, G.V., A.I. SAIDKHODZHAEV und V.M. MALIKOV: Khim. priir. Soedin. 161-64 (1979).
- 128) BAUER, R.F.X., I.A. KHAN, H. LOTTER, H. WAGNER und V. WRAY: Helv. Chim. Acta, 68, 2355-58 (1985).
- 129) WADA, K. und K. MUNAKATA: Tetrahedron Lett. 4677-80 (1968).
- 130) McCURE, R.J., G.A. SIM, P. COGGON und A.T. McPHAIL: Chem. Comm. 128-9 (1970).
- 131) BRUKER-BROSCHÜRE: Two Dimensional NMR (Lit. References) (1982).
- 132) BOHLMANN, F., M. AHMAD, J. JAKOPOVIC und C. JEFFRY: Phytochemistry 20, 251 (1981).
- 133) HITOSHI, M., S. NOSAKA und I. HORIBE: Proc. Chem. Soc. 120-1 (1964).
- 134) WADA, K., Y. ENOMOTO und K. MUNAKOTA: Tetrahedron lett. 3357-60 (1969).
- 135) FISCHER, N.H.: Rev. Latinoamer. Quim. 9, 41 (1978).
- 136) FISCHER, N.H., R.A. WILEY und D.L. PERRY: Rev. Latinoamer. Quim. 7, 87 (1976).
- 137) IRWIN, M.A.: C. A. 75, 137497 (1971).
- 138) BOHLMANN, F. und J. ZIESCHE: Phytochemistry 18, 1489-93 (1979).
- 139) SASTRY, S.D., M.L. MAHESHWARI und S.C. BHATTACHARYA: Tetrahedron Lett. 10, 1035-42 (1966).
- 140) BRANDT, L.: Scand. Haematol. Suppl. 2 (1967).
- 141) BIOZZI, G., B. BENACERRAF und B.N. HALPERN: Br. J. Exp. Pathol. 34, 441 (1953).
- 142) STUPPNER, H.: Dissertation München (1985).
- 143) Stoffliste der ABDA, hrsgg. vom Arzneibüro der Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände, Frankfurt (1986).
- 144) BOHLMANN, F., T. BURCKHARDT und C. ZDERO: "Naturally Occuring Acetylenes", Academic Press London (1973).
- 145) SCHULTE, K.E., G. RÜCKER und J. PERLICK: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 17(7), 82 (1967).
- 146) JACOBSON, M., E.R. ROBERT, D. GILES und MILES JR.: Lloydia 38(16) 4173, (1975).
- 147) FOSTER, S.: Herbalgramm 3 (1985).
- 148) SCHINDLER, H.: Pharmaz. Zentralh. Deutschland 81, 579 u. 589 (1940) und Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 3, 485 (1953).
- 149) WILLUHN, M.: Arzneim.-Forsch. (Drug. Res.) 28(1) (1978).

- 150) ISMAN, B. M. und E. RODRIGUEZ: Phytochemistry 22, 2709-2713 (1983).
- 151) HESSE, M., H. MEIER und B. ZEEH: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie , 2. Auflage Thieme Verlag Stuttgart, New York (1984).
- 152) BEHL, H.M., B. MARCHAND und E. RODRIGUEZ: Z. Naturforsch. 38C, 494-96 (1983).
- 153) BAUER, R., I.A. KHAN, V. WRAY und H. WAGNER: Phytochemistry 26, (1986).
- 154) RODRIGUEZ, E.: Biochemical Systematics and Ecology, 5, 207-218 (1977).
- 155) RODRIGUEZ, E., G.W. REYLOLDS und J.A. THOMSON: Science 211, 1444 (1981).
- 156) WATKINS, S.F., R.F. FRANK, C. GIACOMO, W.R. GARY und E. RODRIGUEZ: J. Nat. Products 48, 631-633 (1985).
- 157) MARIANO, M., F. GRACIELA, R. GARY, ROMO de VIVAR und E. RODRIGUEZ: J. Nat. Products im Druck.

Die vorliegende Arbeit kam unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Hildebert Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München zustande.

Für die große Hilfe und Unterstützung, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit zuteil wurde, möchte ich an dieser Stelle folgenden Personen herzlichst danken:

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Hildebert Wagner, für die großzügige Förderung dieser Arbeit und die zahllosen Anregungen, die er mir durch sein großes Interesse und seine stete Diskussionsbereitschaft geben konnte, verbunden mit einer großen Herzlichkeit, die Ausdruck seines in mich gesetzten Vertrauens war.

Herrn Dr. R. Bauer für die wertvollen wissenschaftlichen Hilfestellungen bei der Durchführung meiner Arbeit. Für die sprachliche Überarbeitung meiner Dissertation möchte ich ihm ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Frau Dr. S. Bladt für die besonders in der Anfangsphase wichtigen Ratschläge und für die vielen Tips aus ihrem reichen Erfahrungsschatz über die Isolierung und Identifizierung von Naturstoffen.

Herrn Dr. P. Wolff für den großen Einsatz, mit dem er für meine Belange eingetreten ist.

Herrn Dr. V. Wray, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH. Braunschweig, für die freundliche Unterstützung durch Aufnahme verschiedener 400 MHz ^1H -NMR und ^{13}C -NMR-Spektren.

Herrn Dr. H. Lotter, für sein großes Engagement bei der Röntgenstrukturanalyse und seine stets kollegiale Unterstützung.

Herrn Dr. O. Seligmann, für die Durchführung der chemisch-physikalischen Untersuchungen ($^1\text{H-NMR}$, MS, IR) und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Frau Dr. K. Jurcic für die freundliche Durchführung der immunologisch-pharmakologischen Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. med. G. May, Klinikum der Johann Wolfgang-von Goethe Universität Frankfurt, für die Durchführung der Teste auf virustatische Wirkung.

Herrn Prof. Dr. A. Mayr und seinen Mitarbeitern, für die Durchführung immunologischer Teste.

Mr. Steven Foster, Ozark Beneficial Plant Project, Brixeys, Missouri, USA, Herrn Dr. F. Heinzer, Fa. Spagyros SA, Boncourt, Schweiz, Herrn Dr. G. Heubl, Botanisches Institut der Universität München, sowie den Firmen Vogel und Weber, Inning, Madaus, Köln, DHU, Karlsruhe, für die Überlassung von authentischem Pflanzenmaterial.

Den Hamdard Laboratories, New Delhi, für die finanzielle Unterstützung am Anfang dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei Herrn Th. Bayer und Herrn B. Kreher für ihre stete Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit.

Darüber hinaus möchte ich noch den vielen nicht genannten Kollegen und Institutsangehörigen herzlich danken, die in verschiedenster Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Ikhlas Ahmad Khan

geboren am 03. 01. 1960

Amroha (Moradabad) Indien

Eltern :

Akhlaq Ahmad Khan , Schuldirektor

Khaliqa Khatoon , Lehrerin

Schulbildung :

1974 HighSchool

Government Intermediate College
(G.I.C.) Amroha

1977 Intermediate

G. I. C. Badaun

1980 B. Sc (Hons)

Aligarh Muslim University (A. M. U.)
Aligarh

1982 M. Sc

A. M. U. Aligarh

1983 Junior Research Fellow (CSIR)

A. M. U. Aligarh (Indien)

Promotionsvorprüfung:

25 Nov 1985

Inst. für Pharmazeut. Biol. München

Wissenschaftliche :

16. Januar 1984 Beginn der

Tätigkeit

vorliegenden Arbeit unter Leitung

von Herrn Prof. Dr. H. Wagner am

Institut für Pharmazeutische

Biologie der Universität München

